MEMORIE
DELL'ACCADEMIA DELLE SCIENZE
DI TORINO

SERIE III, TOMO 3,
e dell'intiera collezione Tomo 114.

PARTE PRIMA:

CLASSE DI SCIENZE FISICHE, MATEMATICHE E NATURALI

TORINO
ACCADEMIA DELLE SCIENZE
1957

INDICE DELLA PARTE PRIMA

DEL TOMO 3, SERIE III

CLASSE DI SCIENZE FISICHE, MATEMATICHE E NATURALI

[* Pagine dell'estratto e ** pagine del Tomo, poste in calce fra ()].

INDUZIONE UNIPOLARE
PRODOTTA DA ELETTROMAGNETI ROTANTI

Memoria del Socio nazionale residente GIANCARLO VALLAURI
presentata nell'adunanza del 23 Novembre 1955

Riassunto. — *In base all'interpretazione del fenomeno dell'induzione unipolare, proposta in uno studio precedente, viene valutato il campo elettrico, prodotto da un solenoide cilindrico percorso da corrente, che è fatto ruotare intorno ad un asse parallelo al suo asse geometrico, ma distinto da questo. Le deduzioni sono confermate da esperienze d'induzione unipolare, compiute su un elettromagnete cilindrico, costituito da 4 solenoidi settorali e fatto ruotare con velocità angolare fin oltre 150 giri/secondo.*

Viene poi esaminato, mediante altre serie di esperienze, il dispositivo in cui l'asse del solenoide e l'asse di rotazione coincidono, e viene chiarita la differenza sostanziale fra i due casi, anche se nelle prove a circuito chiuso, cioè nella misura della corrente indotta e non nel campo elettrico che la genera, si ottengono risultati identici. Si chiarisce cioè, che nel primo caso (appieno equivalente a quello del magnete rotante) il campo elettrico si produce in tutto lo spazio circostante, laddove nel secondo esso si manifesta unicamente nel materiale costituente il rotore. Si mettono infine in rilievo le difficoltà, che ostacolano le misure a circuito aperto, cioè le misure dirette di campo elettrico.

1. *Premessa.* — Il fenomeno della induzione unipolare si manifesta nella nota esperienza, in cui, posto in rotazione un magnete cilindrico (fig. 1) di fronte al tratto esterno e fermo del circuito elettrico $S_1MS_2GS_1$, si rende disponibile in quest'ultimo una f.e.m. $e = f\Phi$ (f = frequenza di rotazione, ossia numero dei giri compiuti in 1s dal magnete; Φ = flusso d'induzione magnetica attraverso il cerchio equatoriale, su cui poggia la spazzola S_2).

Il fenomeno è conseguenza delle proprietà magnetiche del magnete, cioè della sua struttura, che deve considerarsi equivalente ad un sistema di innumerevoli e minuscoli vortici elettrici (o magnetini elementari), dotati ciascuno di un proprio momento magnetico e orientati mediamente nella direzione della magnetizzazione propria del magnete, che coincide con quella dell'asse di rotazione [1].

---

[1] G. VALLAURI, *Effetti d'induzione elettromagnetica. Induzione unipolare.* « Mem. Acc. Sc. », Torino, 1955, 1-3ª, p. 139.

2. *Solenoide elementare rotante.* — Segue dalla premessa, che l'interpretazione dell'induzione unipolare richiede l'esame dell'azione elettromagnetica esercitata, su di un sistema esterno in quiete, dal moto di un solenoide percorso da corrente costante, orientato parallelamente all'asse di rotazione e situato in posizione eccentrica rispetto ad esso, com'è indicato nella figura 2. Il campo magnetico, prodotto dal solenoide in un dato punto del sistema e in un dato istante, è definito dalla rispettiva posizione geometrica del punto e del solenoide e dal momento magnetico $M = \mu_0 Isn$ di quest'ultimo, il quale ha lunghezza l sezione s e numero di spire n, si trova a distanza r dall'asse ed è percorso da corrente I. Il campo magnetico esterno del solenoide equivale al campo coulombiano del magnete di lunghezza l e di carica polare $m = \frac{\mu_0 Isn}{l} = \Phi$.

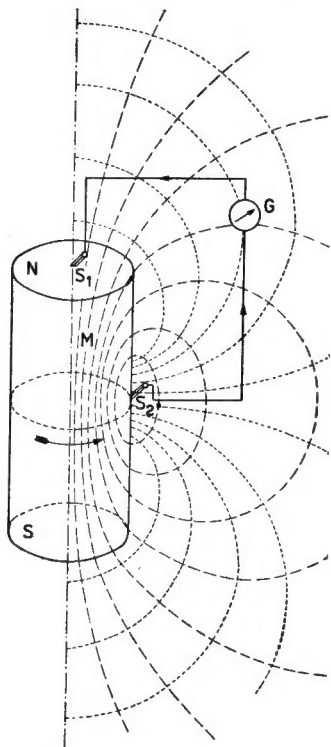



Fig. 1.
Generatore omopolare a magnete rotante.

Fig. 2.
Solenoide rotante.

Tenuto conto del fatto, che col solenoide della figura 2 si vuol rappresentare un semplice filetto elementare della struttura del magnete, giova considerare piccolissima la sezione s ed immaginare concentrate le due masse convenzionali $\pm m$ nei punti estremi, la cui posizione geometrica è definita dalle lunghezze l ed r.

Per effetto del moto del solenoide rispetto al punto considerato, si produce in quest'ultimo un campo elettrico, definito dalla legge dell'in-

duzione $\overline{E} = \overline{v} \wedge \overline{B}$. Tracciato nel sistema un qualunque tratto AB di circuito lineare, supposto fermo, e valutata nel modo ora detto la componente di E secondo ogni elemento dl della linea AB, si può dedurne la f.e.m. $e = \int_A^B \overline{E} \times \overline{dl}$, che risulta disponibile, nell'istante considerato, lungo il tratto AB di circuito.

Se il solenoide è coassiale col sistema in rotazione, il campo $\overline{H}$ e quindi l'induzione $\overline{B} = \mu_0 \overline{H}$ sono invarianti in ogni punto e il campo elettrico è ovunque $\overline{E} = 0$. Se l'asse del solenoide dista di r dall'asse di rotazione, il campo $\overline{H}$ e quindi il campo $\overline{E}$ in un dato punto fermo, sono continuamente variabili in funzione del tempo e, se la velocità angolare $\omega = 2\pi f$ del sistema rotante è uniforme, la loro legge di variazione è periodica con periodo $T = 1/f$.

Se si considera una linea chiusa e ferma di forma qualunque, la f.e.m. in essa indotta ha valor medio diverso da zero, soltanto se la linea è concatenata con uno dei cerchi, costituenti le traiettorie degli estremi del solenoide, cioè se l'asse di questo, durante la rotazione, taglia la linea data. Il valore medio della f.e.m. è in tal caso, per ogni concatenamento, $e = f\Phi$, mentre è nullo in ogni altro caso.

3. *F.e.m. indotta dal solenoide rotante.* — Il valore istantaneo della f.e.m. indotta in una data linea ferma è definito, come si è detto, dal-

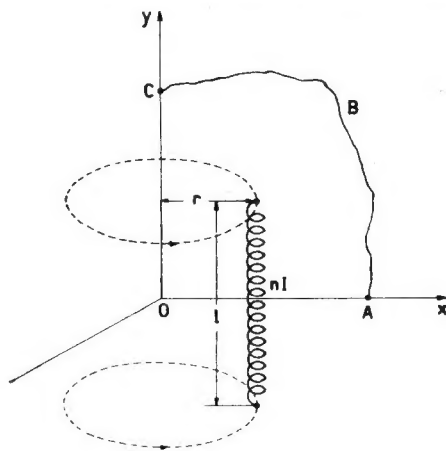



Fig. 3.
Schema di linea chiusa *OABCO*, sede di f.e.m. indotta.

l'integrale del prodotto scalare $\overline{E} \times \overline{dl}$, in cui $\overline{E}$ è dedotto dalla legge dell'induzione. La deduzione è semplice e sufficientemente approssimata, se si suppone che la linea chiusa *OABCO* (fig. 3) giaccia su un piano meridiano, comprenda le parti uscenti dall'origine dei due semiassi, equato-

riale ox e polare oy, e sia completata da un tratto esterno ABC, sufficientemente lontano dal sistema rotante. Quanto più il tratto ABC si allontana dall'origine, tanto più si avvicina a zero il suo contributo alla f.e.m. risultante, la quale risulta perciò espressa da

$$e = e_x + e_y = \int_0^\infty E_x d_x + \int_\infty^0 E_y d_y .$$

Il secondo addendo

$$e_y = \int_\infty^0 E_y dy = \frac{\frac{l}{2}}{\sqrt{r^2 + \frac{l^2}{4}}} f\Phi$$

è indipendente dal tempo. Il primo addendo risulta espresso da

$$e_x = \int_0^\infty E_x dx = \frac{lr}{2} f\Phi \int_0^\infty \frac{\cos \omega t \, dx}{\left(x^2 + r^2 - 2rx \cos \omega t + \frac{l^2}{4}\right)^{3/2}} =$$

$$= \frac{lr}{2} \frac{\cos \omega t}{r^2 \operatorname{sen}^2 \omega t + \frac{l^2}{4}} \left(1 + \frac{r \cos \omega t}{\sqrt{r^2 + \frac{l^2}{4}}} \right) f\Phi ,$$

ove il tempo t s'intende contato dall'istante in cui l'asse del solenoide attraversa il piano xy. Il valore medio di e_x per un intero periodo risulta

$$\left(1 - \frac{\frac{l}{2}}{\sqrt{r^2 + \frac{l^2}{4}}} \right) f\Phi$$

e ciò, mentre conferma per $e = e_x + e_y$ il previsto valor medio $f\Phi$, indica la presenza di una successione di componenti armoniche (dovute esclusivamente alla e_x) costituenti una serie di Fourier

$$e - f\Phi = \mathcal{E}_1 \cos \omega t + \mathcal{E}_2 \cos 2\omega t + \mathcal{E}_3 \cos 3\omega t + \dots \ (^2) .$$

---

(2) A titolo di esempio, nel caso particolare in cui sia $r = \frac{l}{2}$, si ha

$$\frac{e_y}{f\Phi} = 0{,}707$$

$$\frac{e_x}{f\Phi} = 0{,}293 + 0{,}828 \cos \omega t + 0{,}343 \cos 2\omega t + 0{,}142 \cos 3\omega t + 0{,}055 \cos 4\omega t + \dots$$

4. *Elettromagnete costituito da un fascio di solenoidi.* — Il risultato dell'esperienza fondamentale, schematizzata nella figura 1, deve interpretarsi immaginando il magnete costituito per intero da un fascio di solenoidi, analoghi a quello rappresentato nella figura 2 e percorsi dalla corrispondente intensità di corrente continua. Ciò conferma il carattere *granulare* (quantistico) degli effetti d'induzione ([3]). Infatti il medesimo campo magnetico si può produrre, anzi che col fascio di solenoidi, con un unico solenoide coassiale; ma in questo caso la rotazione del solenoide non pro-

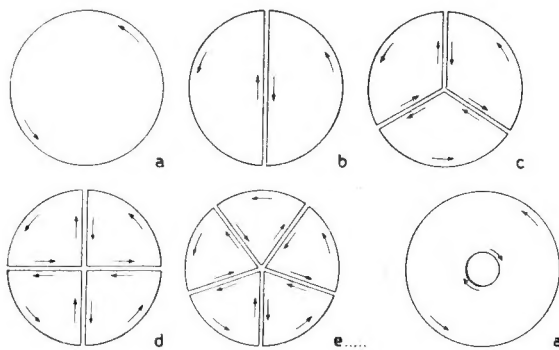



Fig. 4.
Schemi di frazionamento di un solenoide.

duce nello spazio circostante un campo elettromagnetico d'induzione, e l'effetto d'induzione unipolare può bensì manifestarsi anche in questo caso, ma per altra via e in altra sede (§ 6).

La interpretazione del fenomeno prodotto dal fascio di solenoidi, che vengono sostituiti al magnete, è indipendente dal numero di essi e quindi anche dall'area della sezione di ciascuno. Condizione essenziale è che si tratti di solenoidi distinti, il cui asse magnetico non coincida con quello di rotazione. Perciò, se il cerchio indicato nella figura 4*a* rappresenta la sezione del magnete cilindrico, quest'ultimo non può essere sostituito, agli effetti della produzione di campo elettrico esterno dovuto alla propria rotazione, da un unico solenoide, avvolto su un identico cilindro non magnetico e percorso dalla corrente I. Può invece essere sostituito da un numero qualunque di solenoidi eccentrici (fig. 4 *b, c, d, e*...), che abbraccino complessivamente la medesima sezione, abbiano lo stesso numero di spire e siano anch'essi percorsi dalla corrente I, così da produrre ovunque,

([3]) Il principio dell'azione granulare, cioè della necessità di considerare singolarmente l'effetto d'induzione prodotto dal campo di ciascuna carica elementare e non già quello prodotto dal campo risultante di un sistema di cariche, anche se rigidamente collegate fra loro, è stato enunciato (nello studio, di cui alla nota 1) come necessaria conseguenza dell'accordo tra formula di Laplace e legge dell'induzione.

all'interno e all'esterno, il medesimo campo prodotto dal solenoide unico (ammettendo trascurabili le distanze fra le correnti, che percorrono in senso inverso i lati contigui).

5. *Esperienze su un elettromagnete a settori.* — Si è costruito (escludendo completamente l'uso di materiali ferromagnetici) un rotore cilindrico (fig. 5*a*), chiuso entro parete metallica e contenente un sistema di

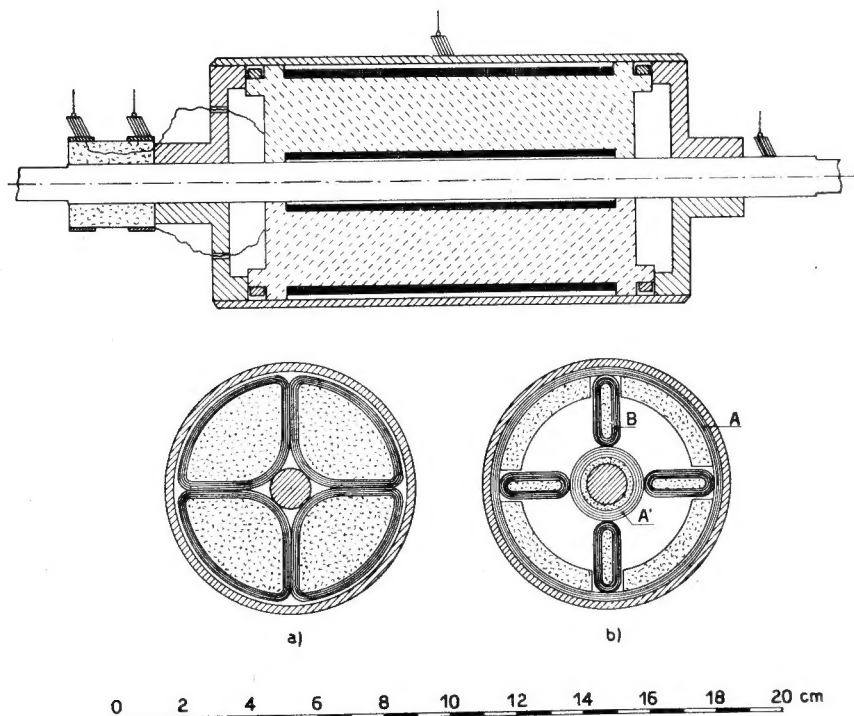



Fig. 5.
Elettromagnete rotante.

4 solenoidi identici. Ciascuno di essi porta un avvolgimento di 498 spire di filo di rame smaltato di diametro 0,7 mm, distribuite su 4 strati, occupanti una lunghezza di 94 mm ed abbraccianti un'area media di 615 mm². I solenoidi sono bloccati rigidamente entro il rotore e gli estremi dell'avvolgimento, costituito collegandoli in serie, fanno capo a due anelli di contatto, attraverso i quali il sistema riceve la corrente continua di eccitazione. Altre due spazzole, striscianti l'una su l'equatore del tamburo, l'altra su l'asse in prossimità della sua uscita dal tamburo medesimo, permettono di chiudere il circuito, in cui agisce la f.e.m. d'induzione unipolare. Il rotore è montato su cuscinetti a sfere, anch'essi non ferromagnetici, ed è comandato, mediante trasmissione, da un motore elettrico regolabile.

Compiuta la necessaria equilibratura, il sistema può essere fatto rotare stabilmente, con regolare funzionamento dei contatti striscianti, fino a frequenze dell'ordine di 167 Hz (10.000 giri/minuto).

Il flusso totale d'induzione, che attraversa il cerchio equatoriale del tamburo metallico (e quindi anche, in senso opposto, tutto il piano equa-

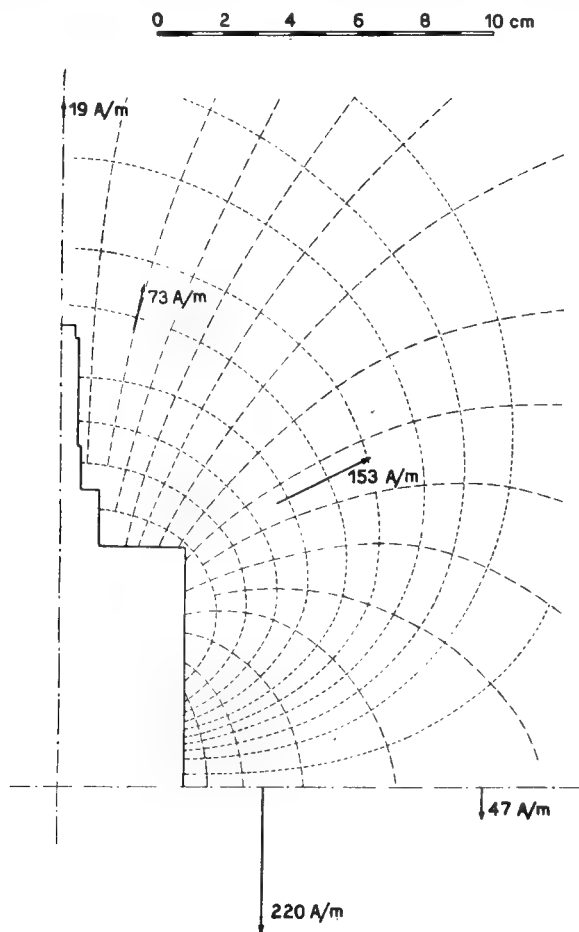



Fig. 6.
Campo magnetico prodotto dal rotore a 4 settori per $I = 0{,}9$ A.

toriale all'esterno di detto cerchio) è stato misurato balisticamente, sia per allontanamento della bobina esploratrice, sia per inversione della corrente continua di eccitazione; e ciò per diversi valori di quest'ultima. I risultati confermano la proporzionalità tra flusso e corrente e dànno $\Phi = 13{,}4 \cdot 10^{-6}$ Wb per $I = 0{,}9$ A. La configurazione del campo in un piano meridiano è stata rilevata per $I = 0{,}9$ A (fig. 6) con misure balistiche

e con l'aiuto di limatura di ferro. All'esterno del tamburo non si riscontra differenza di distribuzione del campo fra due semipiani meridiani, passanti l'uno per l'asse di un solenoide, l'altro per l'intercapedine fra due solenoidi contigui; cioè la distribuzione del campo soddisfa, all'esterno del tamburo, alla condizione di simmetria assiale.

Numerose serie di esperienze sono state eseguite con il dispositivo schematizzato nella figura 7 (4). I risultati, ottenuti a più riprese con diversi

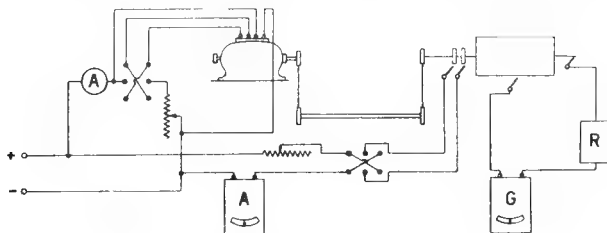



Fig. 7.
Schema del dispositivo di misura.

valori della corrente di eccitazione, sono tutti concordi (si veda, ad esempio, il diagramma superiore della figura 8) e confermano, che la f.e.m. media, generata nel circuito indotto, è identica a quella che si otterrebbe da un magnete permanente di eguali dimensioni e di eguale momento (5).

---

(4) Se, in un dispositivo a induzione unipolare, vien chiuso il circuito della corrente indotta, si deve evidentemente tener conto nel calcolo della f.e.m. (al pari d, quanto si fa per qualunque altro generatore elettromeccanico) dell'effetto di reazione cioè del sovrapporsi al flusso primario del flusso di reazione, prodotto dal campo della corrente indotta. Nel caso delle esperienze a cui si riferiscono le figure 7 e 8, tale effetto è appieno trascurabile, perchè la corrente indotta è contenuta nei limiti di pochi microampere.

(5) Come è stato previsto nel § 3, alla f.e.m. media prodotta da ciascun solenoide si accompagna una serie di componenti armoniche di frequenza f, $2f$, $3f$, ecc.; ma quando, come nelle esperienze descritte, si eccitano simultaneamente e identicamente i 4 solenoidi, tutte le componenti armoniche risultano compensate, tranne quelle di frequenza $4f$, $8f$, $12f$, ecc.

Per mettere in evidenza le componenti di ordine dispari della f.e.m. corrispondente a ciascun solenoide, basta alimentare l'elettromagnete come indicato nella figura 9*a*, cioè eccitare una coppia di solenoidi contigui in verso opposto rispetto all'altra coppia. Sostituendo nel circuito della figura 7 al galvanometro G un sistema opportunamente tarato e composto di un trasformatore elevatore, di un amplificatore e di un galvanometro (fig. 9), si è rilevato che il valore efficace risultante delle armoniche dispari (f, $3f$, $5f$, ecc.) è dovuto quasi esclusivamente alla fondamentale ed ammonta, per ciascun solenoide, a circa il 60% della componente continua.

In modo analogo, collegando i solenoidi come nella figura 9*b*, si rileva la risultante delle armoniche $2f$, $6f$, $10f$, ecc., che ha dato un valore di poco inferiore a quello delle armoniche dispari. Infine, come si è detto, le componenti

6. *Esperienze su un elettromagnete a solenoidi assiali.* — A complemento delle esperienze descritte si è ritenuto opportuno eseguirne altre per mezzo di un secondo elettromagnete, costituito non più da 4 solenoidi settorali, bensì da 2 solenoidi assiali. L'involucro e le altre parti metalliche sono le stesse nei due casi, ma ai 4 solenoidi della figura 5*a* sono stati sosti-

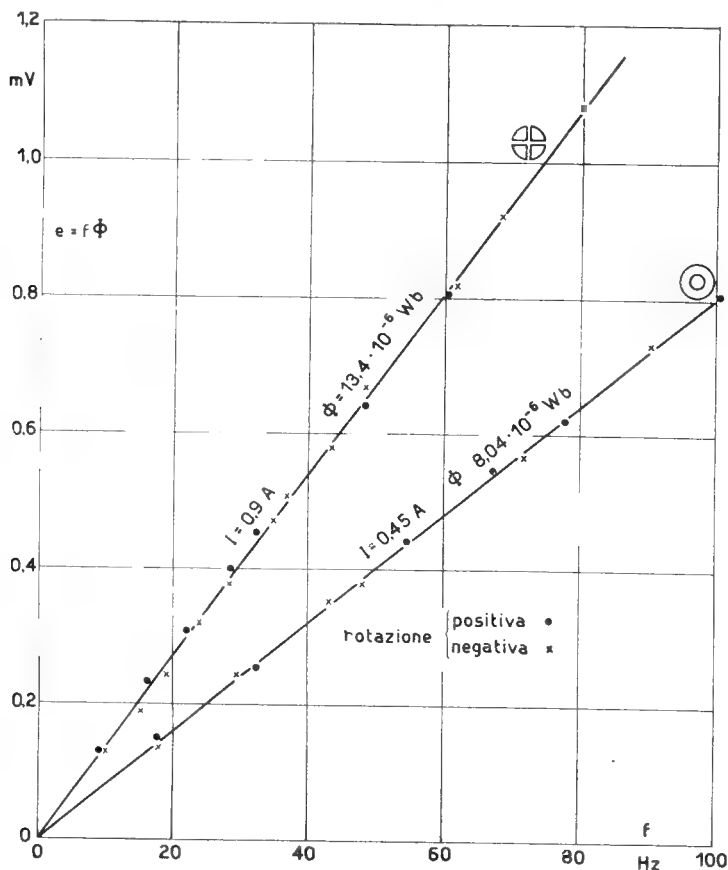



Fig. 8.
F.e.m. d'induzione unipolare in funzione della frequenza di rotazione.

tuiti i due solenoidi cilindrici assiali A e A' della figura 5*b* (fra i quali sono stati poi inseriti anche 4 solenoidi radiali B). I solenoidi A, A', B sono co-

$4f$, $8f$, $12f$, ecc. sono già presenti nel circuito normale (fig. 4*d*) con cui si misura (fig. 7) la f.e.m. media, ma in questo caso la loro risultante si è dimostrata trascurabile rispetto al valor medio $f\Phi$. Facendo poi rotare il sistema con un solo solenoide eccitato (fig. 9*c*) si è rilevato, che il valore efficace della risultante di tutte le armoniche è di poco inferiore al valore della componente continua, in accordo con le altre misure ora esposte. Il rapporto dipende evidentemente dalle dimensioni del solenoide e dalla sua eccentricità.

struiti in modo identico ai precedenti per quanto riguarda lunghezza dell'avvolgimento, numero e strati di spire, sezione e tipo del conduttore. Sul nuovo tamburo sono state eseguite, come nel caso precedente, le misure del flusso che attraversa il cerchio equatoriale, quando l'uno o l'altro o più di uno dei solenoidi sono percorsi da corrente continua in un verso o nell'altro. Con intensità $I = 0{,}9$ A si ha per il solenoide esterno $17{,}33 \cdot 10^{-6}$ Wb, per l'interno $1{,}26 \cdot 10^{-6}$ Wb e per i 4 solenoidi radiali (eccitati contemporaneamente e concordemente) $1{,}80 \cdot 10^{-6}$ Wb.

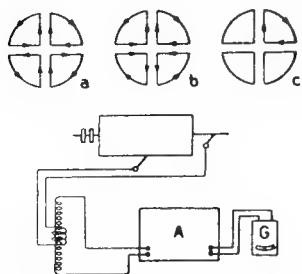



Fig. 9.
Misura delle componenti alternative della f.e.m. indotta.

Giova lasciare da parte, perchè complementari e secondarie (oltre che appieno concordi con le previsioni), le esperienze eseguite eccitando i 4 solenoidi radiali B (da soli o insieme con l'uno o con l'altro o con ambedue i solenoidi assiali) e considerare essenzialmente le prove effettuate eccitando in senso inverso i due solenoidi cilindrici A e A', così da ottenere una configurazione esterna di campo del tutto analoga a quella del caso precedente, rappresentata dalla figura 6. (A pari corrente di eccitazione i valori del campo magnetico risultano maggiori del 20%, in confronto con quelli del caso precedente).

La sezione schematica del dispositivo è ora quella della figura 4a' e viene quindi a mancare nel sistema rotante la presenza di solenoidi eccentrici, il cui movimento possa produrre nello spazio circostante il campo elettrico calcolato nel § 3. Tale campo non sussiste nel caso che ora si considera ([6]). Ma l'assenza del campo elettrico non comporta, che l'effetto d'induzione unipolare, quale si rileva col dispositivo della figura 1, debba mancare, allorchè il magnete vien sostituito dal tamburo contenente i due solenoidi assiali. Invero l'effetto d'induzione si produce anche in questo caso regolarmente, rivelando la disponibilità della medesima f.e.m. $f\Phi$. Ciò è confermato dalle esperienze eseguite, dei cui risultati il diagramma inferiore della figura 8 fornisce un esempio.

L'effetto d'induzione si manifesta dunque egualmente nei due casi; ma la differenza sostanziale permane, perchè, nel caso del magnete o dell'elettromagnete a solenoidi settorali, la rotazione dà luogo alla presenza di campo elettrico in tutto lo spazio circostante e la f.e.m. $f\Phi$ si manifesta lungo l'intero circuito esterno. Per contro, nel caso del solenoide assiale o dei due solenoidi coassiali, il campo elettrico d'induzione non si produce

---

([6]) Le due originarie e contrastanti interpretazioni dell'induzione unipolare, basate sul concetto di flusso d'induzione rigidamente rotante col magnete, ovvero fermo mentre il magnete ruota, sono in questo caso concordi nel ritenere che il flusso resti fermo.

se non nel materiale rotante, e genera quindi la f.e.m. $f\Phi$ esclusivamente lungo le generatrici del tamburo metallico, mentre esse si succedono tra le spazzole S_1 ed S_2 e sono trascinate dal moto di rotazione attraverso il flusso generato dal solenoide. La medesima f.e.m. si produrrebbe identicamente, per effetto della rotazione del tamburo metallico, anche se i solenoidi as-

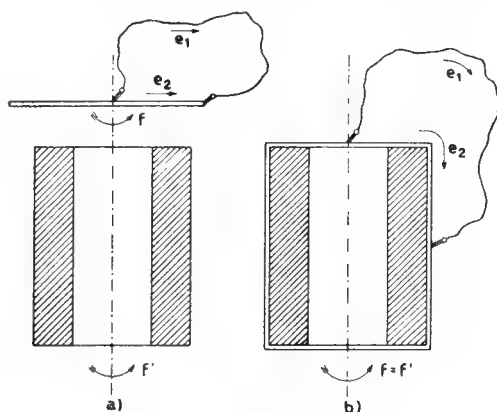



Fig. 10.
Disco di Faraday libero o solidale col sistema induttore.

siali interni A e A' fossero fermi o rotassero per conto proprio in un senso o nell'altro con qualsiasi velocità angolare. Ciò è in pieno accordo con le note esperienze [7] su un disco di Faraday, fatto rotare dinanzi ad un solenoide assiale percorso da corrente, e rotante anch'esso in modo autonomo [8]

---

(7) Si veda ad esempio la figura 1 della nota di G. W. O. HOWE: *Some electromagnetic problems.* « Proc. I. E. E. », 1950, LXXXXVII, p. 129.

(8) La differenza fra il *primo caso* (magnete o fascio di solenoidi eccentrici) ed il *secondo caso* (solenoidi assiali) può essere precisata con riferimento allo schema della figura 10*a*, in cui il disco ruota con frequenza f, il tamburo (contenente il generatore di campo, che mantiene attraverso al disco il flusso costante Φ) ruota con frequenza f' ed il circuito esterno collegante le spazzole ed avente qualunque andamento (eventualmente anche concatenato col tamburo, ma non contenente tratti mobili, nè, conseguentemente, altri contatti striscianti) è tutto fermo. In queste condizioni si ha nel primo caso

$$e_1 = f'\Phi \qquad e_2 = (f' - f)\Phi \qquad e = e_1 - e_2 = f\Phi ,$$

nel secondo

$$e_1 = 0 \qquad e_2 = - f\Phi \qquad e = e_1 - e_2 = f\Phi .$$

Se poi, come nelle esperienze sopra descritte, il disco di Faraday è solidale con l'induttore (fig. 10*b*), si ha $f = f'$ e quindi
nel primo caso

$$e_2 = 0 \qquad e = e_1 = f\Phi ,$$

nel secondo caso

$$e_1 = 0 \qquad e = - e_2 = f\Phi .$$

Se la e dà luogo ad una corrente I, è necessaria l'azione di una coppia motrice $\frac{\Phi I}{2\pi}$. Nel caso della figura 10*a* la coppia deve essere applicata al disco di Faraday,

7. *Esperienze a circuito aperto.* — Lo studio di un dispositivo sperimentale, che fornisca risultati diversi nei due casi, può apparire interessante, anche se non indispensabile per chiarire il fenomeno dell'induzione unipolare. Il dispositivo si presenta comunque di non facile attuazione, perchè esige di rinunciare alla misura della f.e.m. mediante la corrente da essa generata in un circuito chiuso; esige cioè di ricercare e definire sperimentalmente la sede (diversa nei due casi) di quella medesima f.e.m., effettuando misure di campo elettrico E nell'intorno del sistema rotante [9].

Si rileva subito la difficoltà di eseguire misure a circuito aperto, se si tiene presente l'estrema piccolezza dei campi $\bar{E}$ da misurare, quale può facilmente dedursi dai valori delle f.e.m. registrate nei diagrammi della figura 8. Per di più i rilievi possono essere falsati da effetti secondari, dovuti ad esempio alla presenza di conduttori, che si caricano e dànno luogo a campi elettrostatici esterni. In particolare, nel caso dei solenoidi assiali, il tamburo metallico, fatto rotare senza che sia presente il circuito esterno fermo, assume due cariche elettriche complementari, distribuite l'una lungo la fascia equatoriale, l'altra in prossimità di ambedue i poli. Il campo elettrico prodotto da tale effetto secondario, può essere scambiato con quello generato direttamente dalla rotazione del magnete o del tamburo a solenoidi settorali. Converrebbe pertanto ricostruire i due rotori, eliminando l'uso di materiali metallici. Ma ciò non può essere attuato completamente, perchè restano gli avvolgimenti dei solenoidi, nei quali sono presenti d.d.p. dell'ordine di alcuni volt, capaci di determinare campi elettrici perturbatori, eventualmente assai più intensi di quelli, estremamente deboli, che si dovrebbero rilevare.

8. *Conclusione.* — I risultati delle esperienze eseguite e le deduzioni che ne sono state tratte concordano con la nuova interpretazione del fenomeno dell'induzione unipolare, basata sul concetto dell'azione granulare dei magneti elementari. Ciò conferma altresì la simmetria fra elettricità e

---

mentre su l'induttore, comunque esso ruoti, non si esercita alcuna coppia di origine elettromagnetica. Nel caso della figura 10*b* la coppia deve evidentemente essere applicata al rotore unico. In ambedue i casi la coppia di reazione, eguale ed opposta alla coppia motrice, si esercita sul circuito esterno fermo.

(9) Il quesito veniva intuito e proposto già nel 1917 da E. H. Kennard (*On unipolar Induction*, « Phil. Mag. », XXXIII-6*a*, p. 179), il quale affermava, che la questione dell'induzione unipolare « può essere risolta soltanto con esperienze su circuiti aperti ». Ma la questione si imperniava allora unicamente su le due antiche interpretazioni; ed ha continuato ad essere dibattuta così fino agli ultimi tempi, senza che si giungesse ad un accordo. Ciò risulta dalla vasta letteratura dell'argomento, ricordata nello studio precedente (V. nota 1), ed in particolare dalla nota 15 ad esso apposta.

magnetismo [10] ed avvalora l'applicazione del medesimo concetto all'azione delle particelle elettriche; il che ha permesso di far discendere la legge di Biot e Savart, formulata da Laplace, dalla legge dell'induzione.

Torino. Istituto Elettrotecnico Nazionale « Galileo Ferraris ».

G. VALLAURI

INDUCTION UNIPOLAIRE PRODUITE PAR DES ÉLÉCTROAIMANTS TOURNANTS

Sur la base de l'interprétation du phénomène d'induction unipolaire proposée dans un'étude précédente, on évalue le champ éléctrique produit par un solénoïde cylindrique parcouru par un courant et tournant autour d'un axe parallèle à son axe géometrique. Les déductions sont confirmées par des expériences d'induction unipolaire faites sur un éléctroaimant cylindrique constitué par quatre solénoïdes chacun étant un secteur, et tournant à une vitesse angulaire jusqu'à 150 tours/sec.

On examine ensuite, par d'autres séries d'expériences, le cas dans lequel l'axe du solenoïde et l'axe de rotation coincident et on met en evidence la différence fondamentale entre les deux cas, bien que dans les essais à circuit fermé, c'est à dire dans la mesure du courant induit plutôt que du champ éléctrique qui lui donne naissance, les résultats sont identiques.

On met donc en évidence le fait que, dans le premier cas (tout à fait équivalent à celui de l'aimant tournant) le champ éléctrique est produit dans tout l'espace environnant, tandis que, dans le deuxième cas, il se manifeste uniquement dans le matériau qui constitue le rotor.

On met enfin en évidence les difficultés qui rendent difficiles les mesures à circuit ouvert, c'est à dire les mesures directes de champ éléctrique.

G. VALLAURI

UNIPOLAR INDUCTION PRODUCED BY ROTATING ELECTROMAGNETS

On the basis of the interpretation of the unipolar induction phenomenon, which has been proposed in an earlier paper, an evaluation is made of the electric field produced by a cylindrical solenoid, through which current flows, rotating about an axis parallel to but not coincident with its geometric axis. The results

[10] G. VALLAURI, *Induzione elettromagnetica e induzione magnetoelettrica.* « A. F. », 1951, XX, p. 227.

G. VALLAURI, *La legge dell'induzione.* « A. F. », 1953, XXII, p. 211.

E. DURAND, *Théorie générale des masses magnétiques au repos et en mouvement.* « R. G. E. », 1955, LXIV, p. 350.

are confirmed by experiments on unipolar induction. These experiments were carried out on one cylindrical electromagnet formed by 4 sectoral solenoids rotating with angular velocity up to 150 revolutions/second.

Furthermore, with another series of experiments, the arrangement is considered in which the axis of the solenoid and the rotation axis are coincident. The fundamental difference between the two cases is pointed out, although identical results are obtained with the experiments on closed circuit, that is in measuring the induced current and not the electric field which generates it. It is explained that in the first case (completely equivalent to the one of the rotating magnet) the electric field is produced in the whole surrounding space. On the contrary, in the second case, the electric field appears only in the material which forms the rotor. Finally there are emphasized the obstacles which make difficult the measurements on open circuit, that is the direct measurements of electric field.

G. VALLAURI

UNIPOLARE, VON ROTIERENDEN ELEKTROMAGNETEN ERZEUGTE INDUKTION

Auf grund der, in einer früheren Arbeit vorgeschlagenen Erklärung zur unipolaren Induktion, wird das elektrische Feld berechnet, das von einer zylindrischen um eine Achse rotierenden Spule (die parallel ihrer geometrischen Achse, aber von dieser verschieden ist), durch welche Strom fliesst, erzeugt wird. Die Schlussvolgerungen werden durch Versuche mit einem, aus 4 Spulen bestehenden Elektromagneten, der mit einer Winkelgeschwindigkeit von über 150 Umdrehungen/Sekunde dreht, bestätigt.

Überdies werden Versuche auch mit einem anderen Modell, bei dem die Achse der Spule mit der Rotationsachse übereinstimmt, ausgeführt. Es wird gezeigt, dass ein wesentlicher Unterschied zwischen beiden Fallen besteht, obwohl in den Experimenten mit geschlossenem Kreis (Messung des induzierten Stromes und nicht des elektrischen Feldes, welches ihn erzeugt) gleiche Ergebnisse erzielt werden. Es wird erläutert, dass im ersten Fall (der dem Fall vom rotierenden Magneten gleichwertig ist) das elektrische Feld in dem den Rotor umgebenden Raum, und im zweiten Fall nur innerhalb des Rotormaterials erzeugt wird. Zum Schluss werden die Schwierigkeiten, die die Messungen mit offenem Kreis betreffen (direkte Messungen des elektrischen Feldes), aufgezeigt.

AZIONI ELETTROMAGNETICHE FRA SISTEMI IN ROTAZIONE

Memoria del Socio nazionale residente GIANCARLO VALLAURI
presentata nell'adunanza del 16 Maggio 1956

Riassunto. — *Ricordato il carattere convenzionale del concetto coulombiano di massa magnetica, viene chiarita, e confermata sperimentalmente, l'inesistenza di un « effetto di girazione », cioè di una coppia meccanica fra un tratto di conduttore rettilineo di diametro trascurabile, percorso da corrente, e una corona di convenzionali cariche magnetiche, portata da un magnete cilindrico intorno al filo. Sono poi valutate, e verificate sperimentalmente, le azioni che effettivamente si manifestano, con ordine di grandezza affatto minore, quando la corrente fluisce non su l'asse di simmetria del magnete, bensì su strati cilindrici di raggio non trascurabile. Si chiarisce infine, che un'azione meccanica di trascinamento fra due magneti, dovuta esclusivamente al carattere granulare della magnetizzazione, non può essere rilevata sperimentalmente perchè legata a disuniformità aventi dimensioni senza confronto più piccole della distanza minima, a cui possono essere affacciate l'una all'altra le superfici dei magneti.*

AZIONI ELETTROMAGNETICHE FRA SISTEMI IN ROTAZIONE.

1. *Premessa.* — La legge di equivalenza, formulata da Ampère, permette di sostituire idealmente, nella previsione del campo magnetico esterno, un circuito chiuso percorso da corrente I con una fittizia lamina magnetica di eguale contorno e di potenza (momento magnetico per unità di superficie) $P = \mu_0 I$. In base a tale sostituzione si interpreta convenzionalmente il campo magnetico, che in realtà è originato soltanto da movimento relativo (extramolecolare o intramolecolare) di cariche elettriche rispetto al punto considerato, come effetto coulombiano di ipotetiche cariche magnetiche.

Il procedimento offre vantaggi didattici ed anche concettuali, perchè consente di applicare, alle cariche così introdotte, la legge di Coulomb; ma può anche dar luogo ad equivoci ed eventualmente ad errori. Essi derivano principalmente da ciò che, una volta ammessa l'esistenza convenzionale di cariche magnetiche, l'osservatore può essere indotto a con-

siderare singolarmente e indipendentemente l'azione delle cariche positive e quella delle cariche negative, fra loro spazialmente separate, senza tener conto appieno della loro inscindibilità, e del fatto che occorre, in ogni caso ed in ogni fase dello studio di fenomeni elettromagnetici, poter risalire dalla convenzione delle cariche alla interpretazione mediante solenoidi o vortici elettrici.

2. *Effetti di girazione.* — Il problema apparisce meritevole di esame nel caso del movimento di rotazione, per il quale si pone il quesito di ipotetiche coppie elettromeccaniche, e reciprocamente di ipotetiche forze elettromotrici, cui si potrebbe dare il nome di effetti di girazione.

Fig. 1.
Ipotetiche coppie meccaniche fra magnete cilindrico e conduttore assiale percorso da corrente.

Si consideri un magnete cilindrico di momento M, sul cui asse è disposto un sottile conduttore (di cui per ora si considera trascurabile la sezione) percorso dalla corrente I (fig. 1). Le linee di flusso del campo $H = \frac{I}{2\pi r}$, prodotto da quest'ultima, sono cerchi di raggio r, giacenti su piani perpendicolari all'asse ed aventi su di esso il loro centro. Se sul magnete si immaginano presenti due corone simmetriche di cariche magnetiche $\pm m = \frac{M}{l}$ ($l =$ lunghezza equivalente del magnete), la corrente I determina su di esse due coppie eguali ed opposte $c = \pm \frac{mI}{2\pi}$.

Le due coppie si equilibrano fra loro, e non possono essere considerate distinte, perchè l'una o l'altra di esse non può essere in alcun modo rilevata separatamente. Infatti, segando il magnete lungo il suo piano equatoriale *aa* e rendendo indipendenti le due metà, anche se immediatamente contigue, si avrebbero due magneti distinti, dotati ciascuno di carica complessiva nulla, e quindi anche sede di coppia elettromagnetica nulla.

Il quesito reciproco si presenta, quando, pur continuando per ora ad ammettere che il diametro del conduttore percorso dalla I possa considerarsi trascurabile, ci si chieda se sul conduttore si esercita in verso opposto, ma su due tratti distinti, la reazione di ciascuna delle due coppie sopra calcolate. Si può pensare a rendere indipendente, ad esempio mediante l'inserzione di due pozzetti di mercurio come indicato nella figura 1, un tratto opportunamente scelto su la lunghezza del conduttore ed a rilevare, se esso sia soggetto ad una coppia. Anche in questo caso la coppia è nulla.

L'esperienza è stata eseguita col dispositivo indicato nella figura 2 mediante due magneti aventi momento

$$M = m \times l = 9{,}5 \cdot 10^{-4}\,\text{Wb} \times 8{,}4 \cdot 10^{-2}\,\text{m} = 8 \cdot 10^{-5}\,\text{Wb} \cdot \text{m}$$

ed un conduttore di raggio $r = 3$ mm, percorso da $I = 30$ A e montato su cuscinetti a sfere entro un tubo di materiale isolante. La coppia $\dfrac{mI}{2\pi} = 9 \cdot 10^{-3}$ newton · m sarebbe più che doppia della coppia d'attrito di

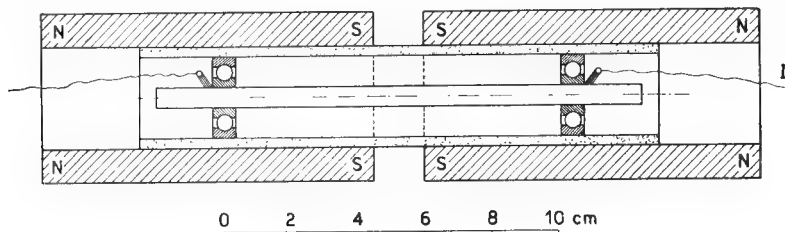



Fig. 2.
Dispositivo sperimentale, che conferma l'inesistenza degli effetti assiali di girazione.

primo distacco, misurata per il sistema rotante cui appartiene l'asta conduttrice; ma questa resta immobile.

Se per contro il dispositivo potesse funzionare, cioè se potesse esistere un motore « a girazione » (o « a frullo ») così concepito, esso dovrebbe essere reversibile, ossia dovrebbe funzionare altresì come dinamo a frullo. Ma anche ciò è da escludere. Infatti facendo rotare l'asta conduttrice della figura 2 (mediante una puleggia montata sul tratto mediano e comandata da apposita trasmissione) con frequenza di oltre 150 giri/secondo, si è constatato che la f.e.m. disponibile fra le spazzole non è rilevabile da un voltmetro sensibile a 10^{-5} V, mentre, secondo l'ipotetico effetto di girazione, dovrebbe essere dell'ordine di $2 \cdot 10^{-1}$ V.

Il fatto, che il sottile conduttore, percorso da corrente e posto su l'asse del magnete fermo, non esercita e non subisce, neppure su singoli tratti, una coppia meccanica avente la grandezza ipoteticamente prevista, è pienamente conforme con la interpretazione del magnetismo. Infatti il campo magnetico, prodotto dalla corrente assiale in un punto situato entro il magnete, esercita quivi, cioè nell'intorno di quel punto, la sua azione su una porzione di materia che ha le proprietà di un magnete elementare. Tale azione si manifesta pertanto in una coppia, non già in una forza tendente a determinare uno spostamento lineare. Se si considera il magnete come un insieme di innumerevoli vortici elettrici, orientati dalle loro azioni reciproche secondo una direzione media prevalente (che è quella della magnetizzazione permanente, conservata dal magnete), l'effetto del campo

prodotto dalla corrente I consiste soltanto in una deviazione di ciascuno dei vortici da quella preesistente direzione media privilegiata; la quale si deforma perciò dall'andamento rettilineo parallelo all'asse in un altro a forma di spirale, senza dar luogo ad una coppia risultante sul magnete o su una parte finita di esso (distribuita simmetricamente rispetto al conduttore assiale).

3. *Effetti d'induzione unipolare.* — È noto [1], che il moto di rotazione ha carattere assoluto e non obbedisce al principio di relatività. Infatti, mentre il conduttore, posto su l'asse del magnete fermo e fatto rotare su se stesso, non diventa sede di campo elettrico, e quindi di f.e.m., lungo alcun tratto della sua lunghezza, la rotazione del magnete intorno al conduttore fermo determina su l'asse, e quindi fa agire sul conduttore medesimo, un campo elettrico. La configurazione di tale campo presenta, per un osservatore fermo, l'andamento indicato dalla figura 3. È noto altresì, che da un campo elettrico così prodotto non si può ricavare una f.e.m. utilizzabile in un tratto di circuito fermo, se quest'ultimo non viene chiuso, per mezzo di contatti striscianti, su un tratto di circuito in moto di rotazione, così come avviene nelle note esperienze sull'induzione unipolare e nel macchinario elettromeccanico da esse derivato.

Fig. 3.
Configurazione del campo elettrico d'induzione prodotto da un magnete tubolare, rotante intorno all'asse.

Se si fa riferimento alla simmetria fra magnetismo ed elettricità, si possono ideare dispositivi corrispondenti a quelli fin qui esaminati, sostituendo al magnete un elettrete di eguale forma; ma in tal caso l'ipotesi di una corrente magnetica assiale è inattuabile, per effetto della inesistenza di reali cariche magnetiche. Si conferma ad ogni modo, che l'effetto di girazione è anche qui da escludere, perchè una sbarretta di materiale magnetico, fatta rotare su se stessa mentre giace su l'asse dell'elettrete fermo, nel tratto abbracciato da una delle corone di cariche elettriche terminali, non si magnetizza. Ciò accade per contro, se la sbarretta, ferma o rotante, si trova in quella medesima posizione, mentre l'elettrete vien fatto rotare intorno ad essa, perchè l'elettrete rotante genera un campo magnetico avente la medesima configurazione del campo elettrico della figura 3.

(1) G. Vallauri, *Effetti d'induzione elettromagnetica. Induzione unipolare.* « Memorie Acc. Scienze », Torino, 8 giugno 1955, I (3ª)-I, p. 139; Pubblicazioni I. E. N., 1955, n. 405.

4. *Azioni fuori dell'asse di simmetria.* — Nelle considerazioni esposte si è esaminato ciò che avviene su l'asse di un sistema di rivoluzione e si è quindi trascurata la sezione del dispositivo, che viene adagiato su detto asse. Se ora si vuole tener conto della sezione del conduttore, posto su l'asse di un magnete cilindrico, è necessario valutare gli effetti della componente radiale del campo magnetico, la quale è nulla soltanto su l'asse e sul piano equatoriale del magnete.

Se il conduttore assiale è un cilindro di raggio r, i singoli filetti elementari paralleli all'asse, da cui si può immaginare che esso sia costituito, si

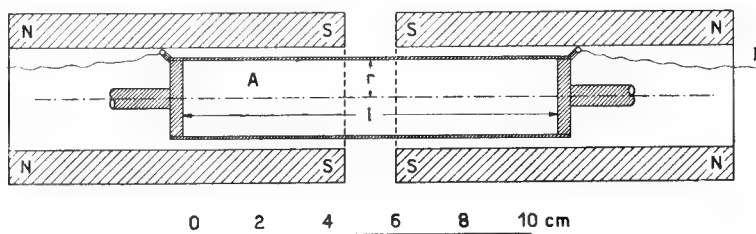



Fig. 4.
Dispositivo per il rilievo degli effetti di f.e.m. e di coppia.

trovano in condizioni diverse rispetto al campo magnetico a seconda della loro distanza dall'asse. Se si indica con Φ_r il flusso di B uscente dalla superficie cilindrica di raggio r nel tratto di conduttore considerato ed avente lunghezza l, la f.e.m. che si manifesta nei filetti giacenti su quella superficie, quando essa vien fatta rotare con frequenza f, è $f\Phi_r$. Analogamente, se I è la corrente che vien fatta passare in direzione assiale nello strato cilindrico di raggio r, la coppia che sollecita detto strato rispetto al magnete risulta $\dfrac{\Phi_r I}{2\pi}$.

Nel dispositivo sperimentale della figura 4 il tratto centrale del rotore è costituito da un cilindro A di materiale dielettrico di raggio $r = 1{,}2$ cm e di lunghezza pari alla distanza fra i piani equatoriali dei due magneti affacciati, $l = 11{,}5$ cm. Sul cilindro A è stato fissato un sottile cilindro di lamina di rame, facente capo ai due dischi metallici terminali, portati ciascuno da un tratto esterno di asse. Il flusso d'induzione, che occupa il foro interno di ciascuno dei due magneti, misurato nel piano equatoriale, è risultato distribuito quivi in modo presso che uniforme e pari, per la sezione massima di raggio $r_0 = 1{,}5$ cm, a $\Phi = 8{,}8 \cdot 10^{-6}$ Wb. Perciò il flusso totale uscente dalla parete cilindrica di raggio r e di lunghezza l risulta $\Phi_r = 2\left(\dfrac{r}{r_0}\right)^2 \Phi$. La f.e.m. disponibile fra le due corone ter-

minali, quando si faccia rotare il tamburo con frequenza f, risulta $e = f\Phi_r = 1{,}76 f \left(\frac{r}{r_0}\right)^2 10^{-5}$ V e la coppia, quando si faccia fluire in direzione assiale nella lamina cilindrica una corrente I, $c = \frac{\Phi_r I}{2\pi} = 2{,}8\, I \left(\frac{r}{r_0}\right)^2 10^{-6}$ newton · m.

Questi valori, confermati sperimentalmente nei limiti di approssimazione delle misure, si verificano soltanto se le spazzole attraverso le quali si ricava la d.d.p. per misurare e o si adduce la corrente I per determinare la coppia c, si trovano anch'esse a distanza r dall'asse (fig. 4). Se, spostando le spazzole sui dischi frontali, si avvicina all'asse il loro punto di contatto, la f.e.m. e la coppia diminuiscono man mano, e si ridurrebbero a zero se i contatti si effettuassero su l'asse. Infatti in quest'ultimo caso f.e.m. e coppia sarebbero espresse ciascuna dalla somma di due addendi eguali ed opposti, relativi l'uno alla superficie cilindrica da cui esce il flusso Φ_r, l'altro ai due dischi terminali, attraverso cui entra il medesimo flusso.

Anche nel caso dei contatti su gli orli del tamburo la f.e.m. e la coppia risultano senza confronto più piccole di quelle che si calcolerebbero, assumendo l'accennata e non ammissibile ipotesi degli effetti assiali di girazione. Infatti in tal caso i valori di e e di c sarebbero indipendenti da $\frac{r}{r_0}$ e verrebbero espressi dalle medesime relazioni, ove in luogo del flusso equatoriale interno $\Phi = 8{,}8 \cdot 10^{-6}$ Wb dovrebbe porsi il flusso totale del magnete, cioè la sua massa equivalente $m = 9{,}5 \cdot 10^{-4}$ Wb, che è oltre 100 volte maggiore.

Le effettive azioni elettromagnetiche qui considerate sono azioni « in loco », perchè dovute al movimento di un conduttore, o al suo attraversamento da parte di corrente, mentre esso è immerso in un campo magnetico. Per contro, negli inesistenti effetti assiali di girazione, f.e.m. e coppia dovrebbero manifestarsi nel conduttore assiale, mentre esso non è immerso in alcun campo magnetico radiale e non può quindi essere sede di alcun effetto d'induzione. Ciò vale rigorosamente, come si è rilevato, se si considera trascurabile la sezione del conduttore. Volendo tenerne conto, si ha, nel caso del dispositivo della figura 2, che la coppia risulta espressa da $c = \frac{\Phi}{2\pi}\left(\frac{r}{r_0}\right)^2 I$, se r è il raggio del conduttore e se si assume chè in esso la densità di corrente sia uniforme. Ne segue (per $\Phi = 8{,}8 \cdot 10^{-6}$, $r = 3 \cdot 10^{-3}$, $I = 30$) $c = 1{,}6 \cdot 10^{-6}$ newton · m, cioè un valore senza confronto più piccolo della coppia $9 \cdot 10^{-3}$, prevista in base all'ipotesi dell'effetto di girazione (§ 2).

5. *Ipotetica azione di trascinamento fra due magneti.* — I due magneti, usati nelle precedenti esperienze (fig. 2 e 4), consentono anche di rispondere al quesito, se sia ammissibile una loro azione reciproca, che si potrebbe chiamare di trascinamento. Posti i due magneti sul medesimo asse (verticale od orizzontale), ed equilibrata l'attrazione reciproca dopo aver ridotto lo spessore dell'interferro al minimo compatibile con la libertà di movimento, si constata che lo spostamento angolare di un magnete di fronte all'altro (fig. 5) non dà luogo ad un'azione di coppia.

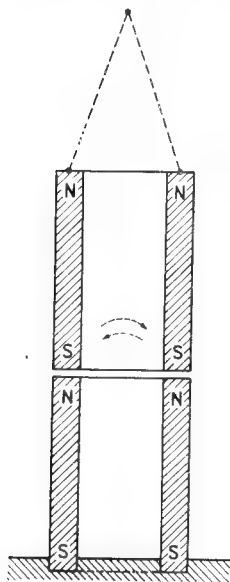



Fig. 5.
Magneti affacciati e suscettibili di reciproco spostamento angolare.

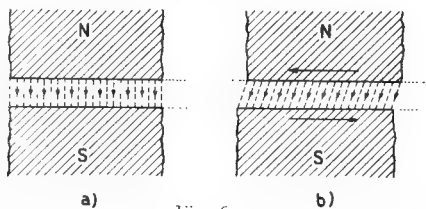



Fig. 6.
Ipotetica deformazione del flusso d'induzione nell'interferro.

La previsione di un effetto di tal genere potrebbe essere suggerita dal concetto di « materializzazione » delle linee di flusso del vettore B (fig. 6*a*), le quali si deformerebbero, per effetto dello spostamento reciproco dei magneti, com'è indicato nella figura 6*b*, e determinerebbero una sollecitazione meccanica, tendente ad annullare la deformazione. Ma quel concetto di « materializzazione » è affatto arbitrario e le conseguenze, che se ne trarrebbero, sono infondate.

Un'azione reciproca sarebbe tuttavia idealmente ammissibile (anche se non rilevabile sperimentalmente) sulla base del carattere « granulare » della magnetizzazione ([1]). Invero il flusso che attraversa la superficie terminale di un magnete non è rigorosamente uniforme, perchè legato alle singole particelle magnetizzate. Se fosse possibile ridurre lo spessore dell'interferro ad un valore dello stesso ordine di grandezza della distanza trasversale interna fra le particelle (il che è impossibile, se non altro, per la impossibilità di ridurre le superfici terminali a piani geometricamente ideali), e se per di più le particelle fossero distribuite ordinatamente e simmetricamente su le due superfici affacciate, una coppia potrebbe manifestarsi in seguito ad uno spostamento angolare estremamente piccolo ([2]).

([2]) È evidente che gli effetti sarebbero del tutto diversi, se si considerasse, anzi che il moto di rotazione di magneti cilindrici, lo spostamento lineare di magneti

Ma sarebbe in ogni caso una coppia di valor medio nullo per qualunque spostamento angolare più ampio di quello, estremamente piccolo, che corrisponde al passaggio da una particella magnetizzata alla successiva.

Ciò si conferma mediante la riproduzione macroscopica già attuata in altre esperienze ([3]), ossia sostituendo ai magneti due elettromagneti settorali identici, dei quali nella figura 7 è rappresentata schematicamente la sezione dei singoli solenoidi. A differenza di quanto si verifica per i magneti, qui si può operare a distanza reciproca molto inferiore a quella inter-

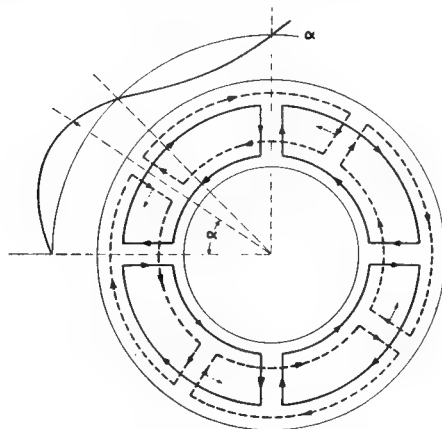



Fig. 7.
Sezione di due elettromagneti settorali sovrapposti.

corrente fra gli assi dei singoli generatori di flusso. Si constata in tal modo, che allo spostamento angolare α fra i due sistemi si accompagna una variazione periodica della coppia, la quale è nulla nelle posizioni di equilibrio (stabile per $\alpha = \left(0, \frac{1}{2}, 1, \frac{2}{3}, \ldots\right)\pi$ e instabile per $\alpha = \left(\frac{1}{4}, \frac{3}{4}, \frac{5}{4}, \frac{7}{4}, \ldots\right)\pi$).
Ma, come si è detto, nel caso dei magneti, pur avvicinati alla minima distanza che ancora consente la reciproca libertà di movimento, la coppia

prismatici, separati da un interferro di estensione finita. In questo caso l'azione degli orli avrebbe influenza affatto preponderante e decisiva. Inoltre una coppia può presentarsi anche nel dispositivo della figura 5, qualora la intensità di magnetizzazione del materiale costituente i due magneti non sia uniforme lungo le corone circolari affacciate l'una all'altra. Si ha in tal caso una coppia finita (di valor medio nullo per un intero ciclo di rotazione), analoga a quella che si rileva nell'esperienza schematizzata nella figura 7.

([3]) G. VALLAURI, *Induzione unipolare prodotta da elettromagneti rotanti.* « Mem. Acc. Scienze », Torino, 23 novembre 1955, III (3^a)-I, p. 1; Pubblicazioni I. E. N., 1955, n. 418.

non è rilevabile. Per le medesime ragioni, quando si inverta uno dei cilindri, cioè si pongano di fronte due campi di direzione opposta, la coppia non è rilevabile nel caso dei magneti ed è invece rilevabile in quello degli elettromagneti (con scambio fra posizioni di equilibrio stabile e posizioni di equilibrio instabile).

6. *Conclusione.* — Le esperienze sopra riferite e le considerazioni sui risultati ottenuti escludono i così detti « effetti di girazione » e confermano: sia la interpretazione delle proprietà dei materiali magnetizzati, sia il significato e la portata della legge dell'induzione, sia infine il carattere di moto assoluto, che è proprio dei movimenti di rotazione.

Torino. Istituto Elettrotecnico Nazionale « Galileo Ferraris ».

G. VALLAURI

ACTIONS ÉLECTROMAGNÉTIQUES ENTRE SYSTÈMES EN ROTATION

Après avoir rappelé le caractère conventionnel de la notion coulombienne de masse magnétique, on démontre et on confirme expérimentalement l'inexistence d'un « effet giratoire », c'est-à-dire d'un couple mécanique entre une partie d'un conducteur rectiligne de diamètre négligeable, parcouru par un courant, et une couronne de charges magnétiques conventionnelles, portées par un aimant cylindrique entourant le fil.

On évalue ensuite et on vérifie expérimentalement les actions qui, dans un ordre de grandeur bien inférieur, se manifestent effectivement, quand le courant passe dans les parties du conducteur qui ne coïncident pas avec l'axe de symétrie de l'aimant, mais plutôt dans des couches cylindriques de rayon non négligeable.

On établit enfin qu'une action mécanique d'entraînement entre deux aimants, due esclusivement au caractère « granulaire » du magnétisme, ne peut être démontrée expérimentalement parce qu'elle est liée à des manques de continuité ayant des dimensions infiniment plus petites que la plus faible distance à laquelle on puisse rapprocher les surfaces des deux aimants.

G. VALLAURI

ELECTROMAGNETIC EFFECTS BETWEEN ROTATING SYSTEMS

After mentioning the conventional aspect of the Coulomb concept of magnetic mass, the non existence of a « giratory effect » is explained and experimentally confirmed. In other words no mechanic torque arises between an element of straight conductor of negligible diameter, through which current flows, and a ring of conventional magnetic charges, carried by a cylindrical magnet around the conductor. Furthermore there are evalueted and experimentally verified the effects which actually take place, when the current flows not along the axis of simmetry of the magnet but

on cylindrical layers of appreciable radius. Finally it is explained that a mechanic effect of coupling between two magnets, due only to the granular property of magnetization, cannot be experimentally detected. This is because it is dependent on non-uniformities having dimensions much smaller than the minimum possible distance between the surfaces of the magnets.

G. Vallauri

ELEKTROMAGNETISCHE WIRKUNGEN ZWISCHEN ROTIERENDEN SYSTEMEN

Nachdem die konventionellen Eigenschaften des Coulomb'schen Konzepts über die magnetische Masse erwähnt werden, erläutert und bestätigt man durch Experimente dass kein Rotationsbewegungs effekt besteht. Das bedeutet, dass kein mechanisches Drehmoment entsteht aus der Wirkung zwischen einem Stück eines geraden Leiters mit vernachlässigbarem Durchmesser und einem Ring konventioneller magnetischer Ladungen, wenn diese Ladungen ihren Sitz auf einem zylindrischen Magneten haben, dessen Achse mit dem geraden Leiter zusammenfällt. Weiterhin wird eine Rechnung durchgeführt für den Fall, dass der Strom nicht mehr durch den unendlich dünnen Leiter fliesst sondern auf einem Zylindermantel. Versuche bestätigen die Überlegung. Endlich erklärt man, dass eine mechanische Kupplungswirkung zwischen Magneten, hervorgerufen durch die «körnige Eigenschaft» der Magnetisierung, nicht im Experimente aufgefunden werden kann; da diese Kupplungswirkung von Inhomogenitäten des Materials abhängt und der Abstand der Ungleichmässigkeiten viel kleiner ist als der minimale Abstand mit dem die Magnetoberflächen gegenüberstehen können.

SULLA DIFFERENZIABILITÀ E L'ANALITICITÀ DELLE ESTREMALI DEGLI INTEGRALI MULTIPLI REGOLARI (*)

Memoria di ENNIO DE GIORGI
presentata dal Socio nazionale non residente Mauro PICONE
nell'adunanza del 24 Aprile 1957

Riassunto. — *Si studiano le estremali di alcuni integrali multipli regolari, supponendo nota a priori l'esistenza delle derivate parziali prime di quadrato sommabile; si dimostra il carattere hölderiano di tali derivate, da cui seguono l'indefinita differenziabilità e l'analiticità delle estremali.*

In questo lavoro mi occupo delle proprietà differenziali e specialmente dell'analiticità delle estremali degl'integrali multipli regolari; tale argomento è stato oggetto di molte ricerche da parte di matematici italiani e stranieri, sicchè appare assai difficile darne un quadro bibliografico completo; ci limiteremo quindi a citare qualche lavoro da cui il lettore potrà facilmente ricavare più ampie informazioni. Ricorderemo così i risultati di Hopf [3] ([1]), Stampacchia [9], Morrey [6], che danno teoremi di differenziabilità ed analiticità per estremali sempre meno regolari: precisamente si richiede l'esistenza di derivate seconde hölderiane in [3], di derivate prime hölderiane in [9], di derivate prime continue in [6]. A un diverso indirizzo appartengono invece altri risultati ottenuti da Stampacchia in [9]: egli parte dai teoremi di esistenza ottenuti coi metodi diretti del calcolo delle variazioni, nei quali le soluzioni vengono ricercate in classi assai ampie di funzioni, e studia le proprietà di queste soluzioni (a priori assai poco regolari) dimostrando, fra l'altro, l'esistenza di derivate parziali seconde di quadrato sommabile, soddisfacenti quasi ovunque l'equazione di Eulero.

Mancavano però, per quanto mi risulta, (qualora si escludano gli integrali doppi per i quali rinviamo il lettore a [2], [5], [7], [8] e qualche caso

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto Nazionale per le Applicazioni del Calcolo.

([1]) Il numero fra parentesi quadra è quello che compete al lavoro citato nella bibliografia riportata alla fine della Memoria.

particolare di integrali multipli, come quello degl'integrali quadratici che danno luogo ad equazioni di Eulero lineari) teoremi che facessero per così dire da ponte fra i risultati ottenuti nel primo indirizzo e quelli ottenuti nel secondo, assicurando che le soluzioni trovate coi metodi diretti del calcolo delle variazioni considerate in [9] soddisfano le condizioni richieste in [6]; lo scopo di questo lavoro è appunto la dimostrazione di un primo teorema di questo tipo (precisamente il teor. III) (2). Tale dimostrazione è fondata sullo studio di alcune funzioni (caratterizzate da certe diseguaglianze integrali) delle quali col teor. I si prova il carattere hölderiano; fra i risultati intermedi noteremo il teor. II per l'interesse che può avere anche in altre questioni relative ad equazioni differenziali di tipo ellittico.

L'argomento di questa ricerca mi è stato suggerito da alcune conversazioni col prof. G. Stampacchia, che qui ringrazio per le informazioni ed i consigli che mi sono stati assai utili in questo lavoro.

1. — Nello spazio euclideo r-dimensionale S_r consideriamo un campo E ed indichiamo con $\mathfrak{A}^{(2)}(E)$ la classe delle funzioni $w(x)$ quasi continue in E e soddisfacenti le condizioni seguenti:

1^a) *$w(x)$ è assolutamente continua su quasi tutti i segmenti paralleli agli assi coordinati contenuti in E.*

2^a) *$w(x)$ e le sue derivate parziali prime sono funzioni di quadrato sommabile in ogni insieme chiuso e limitato contenuto in E.*

Dato un numero positivo γ, chiameremo $\mathfrak{B}(E;\gamma)$ la classe delle funzioni $w(x)$ che oltre alle condizioni 1^a) e 2^a) soddisfano la

3^a) *Comunque si fissino un punto $y \in E$ (3) (di cui $\delta(y)$ sia la distanza da $S_r - E$) e tre numeri k, ϱ_1, ϱ_2 (con $0 < \varrho_1 < \varrho_2 < \delta(y)$), si ha*

$$\frac{\gamma}{(\varrho_2-\varrho_1)^2}\int_{A(k)I(\rho_2;y)}(w(x)-k)^2dx_1\dots dx_r \geq \int_{A(k)I(\rho_1;y)}|\text{grad}\, w|^2 dx_1 \dots dx_r\,, \tag{1}$$

$$\frac{\gamma}{(\varrho_2-\varrho_1)^2}\int_{B(k)I(\rho_2;y)}(w(x)-k)^2dx_1\dots dx_r \geq \int_{B(k)I(\rho_1;y)}|\text{grad}\, w|^2 dx_1 \dots dx_r\,, \tag{1'}$$

ove si indica con $I(\varrho;y)$ l'intorno di raggio ϱ di y, con $A(k)$ l'insieme dei punti di E ove è $w(x) > k$, con $B(k)$ l'insieme di quelli ove è $w(x) < k$.

---

(2) Questo teorema è stato comunicato oralmente al Congresso dell'U.M.I. che ha avuto luogo a Pavia fra il 6 e l'11 ottobre 1955 e poi esposto nella nota preventiva [1].

(3) Il simbolo $y \in E$ significa: y appartiene ad E; quello $E \subset L$ significa: E è contenuto in L.

Una prima proprietà della classe $\mathfrak{B}(E;\gamma)$ ora definita che ci sarà utile in seguito è data dal

Lemma I. — Assegnata una successione di funzioni

$$w_1(x), \ldots, w_n(x), \ldots \tag{2}$$

appartenenti a $\mathfrak{B}(E;\gamma)$ ed aventi quadrato sommabile in E, se la (2) *converge in media in E verso una funzione $w(x)$, cioè si ha*

$$\lim_{n\to\infty}\int_E [w_n(x) - w(x)]^2 dx_1 \ldots dx_r = 0\,, \tag{3}$$

allora $w(x)$ appartiene a $\mathfrak{B}(E;\gamma)$.

Dim. Infatti, poichè le funzioni della successione (2) appartengono a $\mathfrak{B}(E;\gamma)$, sarà, per $y\,\mathcal{E}\,E$, $0 < \varrho_1 < \varrho_2 < \delta(y)$

$$\int_{I(\rho_1;y)} |\mathrm{grad}\, w_n|^2 dx_1 \ldots dx_r \leq \frac{\gamma}{(\varrho_1 - \varrho_2)^2}\int_{I(\rho_2;y)} |w_n(x)|^2 dx_1 \ldots dx_r \tag{4}$$

e quindi per la (3)

$$\lim_{n\to\infty}{}'' \int_{I(\rho_1;y)} |\mathrm{grad}\, w_n|^2 dx_1 \ldots dx_r \leq \frac{\gamma}{(\varrho_2 - \varrho_1)^2}\int_{I(\rho_2;y)} |w(x)|^2 dx_1 \ldots dx_r\,. \tag{5}$$

Dalla (5), per l'arbitrarietà di y, ϱ_1, ϱ_2, si deduce che, comunque si fissi un insieme chiuso e limitato $C\mathbf{C}E$, gli integrali estesi a C delle norme dei gradienti delle funzioni (2) descrivono una successione limitata; ne segue, per note proprietà delle successioni di funzioni aventi derivate prime di quadrato sommabile, che $w(x)\,\mathcal{E}\,\mathfrak{A}^{(2)}(E)$.

Per provare poi che $w(x)$ soddisfa la (1), basta osservare che, posto per ogni numero reale k e per ogni intero positivo n

$$w_n(x;k) = \begin{cases} w_n(x) - k & \text{per} \quad w_n(x) \geq k \\ 0 & \text{per} \quad w_n(x) \leq k\,, \end{cases} \tag{6}$$

la successione

$$w_1(x;k), \ldots, w_n(x;k), \ldots \tag{7}$$

converge in media in E verso la funzione $w(x;k)$ data dalle

$$w(x;k) = \begin{cases} w(x) - k & \text{per} \quad w(x) \geq k \\ 0 & \text{per} \quad w(x) \leq k\,. \end{cases} \tag{8}$$

Si avrà pertanto, per $y \in E$, $0 < \varrho < \delta(y)$,

$$\lim_{n\to\infty} \int_{I(\rho;y)} [w_n(x;k)]^2 dx_1 \dots dx_r = \int_{I(\rho;y)} [w(x;k)]^2 dx_1 \dots dx_r , \tag{9}$$

$$\lim_{n\to\infty}{}' \int_{I(\rho;y)} |\text{grad}_x w_n(x;k)|^2 dx_1 \dots dx_r \geq \int_{I(\rho;y)} |\text{grad}_x w(x;k)|^2 dx_1 \dots dx_r ; \tag{10}$$

dalle (9), (10), poichè per ipotesi le funzioni $w_n(x)$ appartengono a $\mathfrak{B}(E;\gamma)$, si deduce che $w(x)$ soddisfa la (1); analogamente si potrebbe ragionare per la (1') e quindi è dimostrato che $w(x) \in \mathfrak{B}(E;\gamma)$.

2. — Pensiamo di aver fissato un campo $E \subset S_r$, una costante positiva γ, una funzione $w(x) \in \mathfrak{B}(E;\gamma)$ ed un punto $y \in E$; riprendendo le notazioni del n. 1, poniamo

$$I(\varrho) = I(\varrho; y)$$
$$A(k;\varrho) = A(k) \cdot I(\varrho; y)$$
$$B(k;\varrho) = B(k) \cdot I(\varrho; y) .$$

Stabilite queste ipotesi, che verranno conservate in tutto questo capitolo, passiamo alla dimostrazione del

Lemma II. — Esiste una costante β_1 tale che, per ogni terna di numeri ϱ, k, λ verificanti le

$$0 < \varrho < \delta(y) , \qquad k < \lambda \tag{1}$$

si abbia

$$\beta_1 \int_{[A(k;\rho)-A(\lambda;\rho)]} |\text{grad}\, w| dx_1 \dots dx_r \geq (\lambda - k)[\tau(k,\lambda;\varrho)]^{\frac{r-1}{r}} , \tag{2}$$

ove col simbolo $\tau(k,\lambda;\varrho)$ si indica il più piccolo dei due numeri mis $A(\lambda;\varrho)$, mis $[I(\varrho) - A(k;\varrho)]$.

Dim. Per ogni insieme $L \subset S_r$ che sia contenuto nella somma di un numero finito di iperpiani e di ipersuperfici sferiche, indicheremo con il simbolo $\mu_{r-1}L$ la misura $(r-1)$ — dimensionale di L (elementarmente definita).

Per ogni dominio D di S_r chiameremo *semilineari* in D le funzioni $g(x) = g(x_1, \dots, x_r)$ continue in D che godono della proprietà seguente: è possibile decomporre D nella somma di un numero finito di domini, in ognuno dei quali $g(x)$ è lineare (cioè costante o eguale ad un polinomio di

primo grado nelle variabili $x_1, \ldots, x_r$); geometricamente la proprietà ora enunciata può esprimersi dicendo che l'ipersuperficie dello spazio $(r+1)$ — dimensionale S_{r+1} di equazioni

$$x_{r+1} = g(x_1, \ldots x_r); \qquad (x_1, \ldots x_r) \mathcal{E} D \tag{3}$$

è contenuta nella somma di un numero finito di iperpiani di S_{r+1}.

Stabilite queste convenzioni passiamo alla dimostrazione del nostro lemma nell'ipotesi che $w(x)$ sia semilineare nel dominio $[I(\varrho) + \mathfrak{F}I(\varrho)]$; in tal caso le frontiere $\mathfrak{F}A(t;\varrho)$, $\mathfrak{F}B(t;\varrho)$ dei campi $A(t;\varrho)$, $B(t;\varrho)$ saranno sempre contenute nella somma di un numero finito di iperpiani e dell'ipersuperficie sferica $\mathfrak{F}I(\varrho)$. Inoltre, per quasi tutti i valori di t, sarà

$$\mu_{r-1}\mathfrak{F}A(t;\varrho) = \mu_{r-1}[I(\varrho)\mathfrak{F}A(t)] + \mu_{r-1}[A(t)\cdot\mathfrak{F}I(\varrho)]\,, \tag{4}$$

$$\mu_{r-1}\mathfrak{F}B(t;\varrho) = \mu_{r-1}[I(\varrho)\mathfrak{F}B(t)] + \mu_{r-1}[B(t)\cdot\mathfrak{F}I(\varrho)]\,, \tag{4'}$$

$$\operatorname{mis} I(\varrho) = \operatorname{mis} A(t;\varrho) + \operatorname{mis} B(t;\varrho) \tag{5}$$

$$\mu_{r-1}\mathfrak{F}I(\varrho) = \mu_{r-1}[B(t)\mathfrak{F}I(\varrho)] + \mu_{r-1}[A(t)\cdot\mathfrak{F}I(\varrho)] \tag{6}$$

$$I(\varrho)\cdot\mathfrak{F}B(t) = I(\varrho)\cdot\mathfrak{F}A(t)\,. \tag{7}$$

Per la semilinearità di $w(x)$ avremo poi, comunque si scelga il numero ξ,

$$\int_{A(\xi;\rho)} |\operatorname{grad} w|\,dx_1 \ldots dx_r = \int_{\xi}^{+\infty} \mu_{r-1}[I(\varrho)\mathfrak{F}A(t)]\,dt\,. \tag{8}$$

D'altra parte, per le note (4) proprietà isoperimetriche delle ipersfere, esisterà una costante $\alpha(r)$ tale che risulti

$$\begin{cases} [\operatorname{mis} I(\varrho)]^{1-\frac{1}{r}} = \alpha(r)\mu_{r-1}\mathfrak{F}I\cdot(\varrho) \\ [\operatorname{mis} A(t;\varrho)]^{1-\frac{1}{r}} \leq \alpha(r)\mu_{r-1}\mathfrak{F}A(t;\varrho) \\ [\operatorname{mis} B(t;\varrho)]^{1-\frac{1}{r}} \leq \alpha(r)\mu_{r-1}\mathfrak{F}B(t;\varrho) \end{cases} \tag{9}$$

e quindi, tenendo presenti le (4), (4'), (5), (6), (7), (9), troviamo per quasi tutti i valori di t

$$2\alpha(r)\mu_{r-1}[I(\varrho)\cdot\mathfrak{F}A(t)] \geq [\operatorname{mis} A(t;\varrho)]^{1-\frac{1}{r}} + \\ + (\operatorname{mis}[I(\varrho) - A(t;\varrho)])^{1-\frac{1}{r}} - [\operatorname{mis} I(\varrho)]^{1-\frac{1}{r}}; \tag{10}$$

---

(4) Si osservi che qui intervengono solo domini le cui frontiere sono contenute nella somma di un numero finito di iperpiani ed ipersuperfici sferiche.

detto $\tau(t;\varrho)$ il più piccolo dei due numeri mis $A(t;\varrho)$ e mis $[I(\varrho)-A(t;\varrho)]$ sarà certo mis $I(\varrho)\geq 2\tau(t;\varrho)$ e la (10) diventa

$$(11)\qquad 2a(r)\mu_{r-1}[I(\varrho)\cdot\mathfrak{F}A(t)]\geq[\tau(t;\varrho)]^{1-\frac{1}{r}}+$$

$$+[\operatorname{mis}I(\varrho)-\tau(t;\varrho)]^{1-\frac{1}{r}}-[\operatorname{mis}I(\varrho)]^{1-\frac{1}{r}}\geq 2[\tau(t;\varrho)]^{1-\frac{1}{r}}-[2\tau(t;\varrho)]^{1-\frac{1}{r}}.$$

Se ora poniamo

$$(12)\qquad \beta_1=\frac{a(r)}{1-2^{-\frac{1}{r}}}$$

e teniamo presente che, per $\lambda\geq t\geq k$, è certo $\tau(t;\varrho)\geq\tau(k,\lambda;\varrho)$ dalle (8), (11), (12) ricaviamo la (2).

Passiamo ora alla dimostrazione del nostro lemma nell'ipotesi che $w(x)$ non sia semilineare; allora, per noti teoremi sull'approssimazione lineare, potremo trovare una successione di funzioni semilineari nel dominio $[I(\varrho)+\mathfrak{F}I(\varrho)]$

$$w_1(x),\ w_2(x),\ \ldots,\ w_n(x),\ \ldots,$$

verificanti le

$$(13)\qquad \lim_{n\to\infty}\int_{I(\rho)}|w(x)-w_n(x)|\,dx_1\ldots dx_r=$$

$$=\lim_{n\to\infty}\int_{I(\rho)}|\operatorname{grad}w-\operatorname{grad}w_n|\,dx_1\ldots dx_r=0\,.$$

Detto $A_n(t;\varrho)$ l'insieme dei punti $x\in I(\varrho)$ nei quali è $w_n(x)>t$, per ogni coppia di numeri k,λ (con $k<\lambda$), indicheremo con $\tau_n(k,\lambda;\varrho)$ il più piccolo dei due numeri mis $A_n(\lambda;\varrho)$, mis $[I(\varrho)-A_n(k;\varrho)]$.

Con ragionamento analogo a quello seguito per provare la (2) nel caso di $w(x)$ semilineare, si dimostra la

$$(14)\qquad \beta_1\int_{[A_n(k;\rho)-A_n(\lambda;\rho)]}|\operatorname{grad}w_n|\,dx_1\ldots dx_r\geq(\lambda-k)[\tau_n(k,\lambda;\varrho)]^{1-\frac{1}{r}}$$

per ogni intero positivo n e per ogni coppia di numeri reali k,λ (con $k<\lambda$). D'altra parte dalle (13) si deduce, per quasi tutti i valori di t,

$$(15)\qquad \lim_{n\to\infty}\operatorname{mis}[A_n(t;\varrho)+A(t;\varrho)-A_n(t;\varrho)A(t;\varrho)]=0$$

e quindi dalle (13), (14), (15) si deduce che vale la (2) per quasi tutte le coppie k,λ (con $k<\lambda$). Ma è facile vedere che se la (2) vale per quasi tutte

le coppie k, λ (con $k < \lambda$) essa vale sempre; basta osservare che

$$\lim_{\eta \to 0^+} \int_{[A(k+\eta;\rho)-A(\lambda-\eta;\rho)]} |\operatorname{grad} w| \, dx_1 \dots dx_r \leq \int_{[A(k;\rho)-A(\lambda;\rho)]} |\operatorname{grad} w| \, dx_1 \dots dx_r \,, \tag{16}$$

$$\lim_{\eta \to 0^+} \tau(k+\eta, \lambda-\eta; \varrho) \geq \tau(k, \lambda; \varrho) \,. \tag{17}$$

Lemma III. — Esiste una costante β_2 tale che, per ogni coppia di numeri ϱ, k soddisfacenti le condizioni

$$0 < \varrho < \delta(y), \; 0 < 2 \operatorname{mis} A(k;\varrho) \leq \operatorname{mis} I(\varrho) \,, \tag{18}$$

sia

$$\beta_2 \int_{A(k;\rho)} |\operatorname{grad} w|^2 dx_1 \dots dx_r \geq \tag{19}$$

$$\geq [\operatorname{mis} A(k;\varrho)]^{-\frac{2}{r}} \int_{A(k;\rho)} [w(x) - k]^2 dx_1 \dots dx_r \,.$$

Dim. Per ogni intero positivo n, indichiamo con λ_n il più piccolo dei numeri λ che verificano la

$$\operatorname{mis} A(k;\varrho) \geq 2^{nr} \operatorname{mis} A(\lambda;\varrho) \tag{20}$$

e poniamo $\lambda_0 = k$; sarà evidentemente

$$k = \lambda_0 \leq \lambda_1 \leq \dots \leq \lambda_n \leq \dots \tag{21}$$

e, per la definizione degli insiemi $A(\lambda;\varrho)$, $B(\lambda;\varrho)$,

$$\lim_{\epsilon \to 0^+} \operatorname{mis} A(\lambda_n + \varepsilon; \varrho) = \operatorname{mis} A(\lambda_n;\varrho) \leq 2^{-rn} \operatorname{mis} A(k;\varrho) \leq \tag{22}$$

$$\leq \operatorname{mis} [I(\varrho) - B(\lambda_n;\varrho)] = \lim_{\epsilon \to 0^+} \operatorname{mis} A(\lambda_n - \varepsilon; \varrho) \,.$$

Dalle (22) si deduce l'esistenza di una successione di insiemi

$$A(k;\varrho) = D_0 \supset D_1 \supset \dots \supset D_n \supset \dots \tag{23}$$

tali che per ogni valore di n sia

$$\operatorname{mis} D_n = 2^{-nr} \operatorname{mis} A(k;\varrho) \tag{24}$$

$$[I(\varrho) - B(\lambda_n;\varrho)] \supset D_n \supset A(\lambda_n;\varrho) \,. \tag{24'}$$

Dal lemma II e dalle (18), (22), (24′) segue

$$\beta_1 \int_{(D_{n-1}-D_n)} |\operatorname{grad} w| \, dx_1 \dots dx_r \geq \lim_{\epsilon \to 0^+} \beta_1 \int_{[A(\lambda_{n-1}+\epsilon;\rho)-A(\lambda_n-\epsilon;\rho)]} |\operatorname{grad} w| \, dx_1 \dots dx_r \geq \tag{25}$$

$$\geq 2^{-n(r-1)} (\lambda_n - \lambda_{n-1}) \, [\operatorname{mis} A(k;\varrho)]^{\frac{r-1}{r}}$$

e quindi per la diseguaglianza di Schwarz e le (24), (25), si trova

$$\beta_1^2 \int_{(D_{n-1}-D_n)} |\operatorname{grad} w|^2 \, dx_1 \dots dx_r \geq \tag{26}$$

$$\geq [\operatorname{mis}(D_{n-1} - D_n)]^{-1} \left(\beta_1 \int_{(D_{n-1}-D_n)} |\operatorname{grad} w| \, dx_1 \dots dx_r \right)^2 \geq$$

$$\geq (\lambda_n - \lambda_{n-1})^2 \, [\operatorname{mis} A(k;\varrho)]^{\frac{r-2}{r}} \, 2^{-n(r-2)-r} \, .$$

Dalle (23), (26) segue

$$\beta_1^2 \int_{A(k;\rho)} |\operatorname{grad} w|^2 \, dx_1 \dots dx_r \geq \tag{27}$$

$$\geq \sum_{n=1}^{\infty} (\lambda_n - \lambda_{n-1})^2 \, [\operatorname{mis} A(k;\varrho)]^{\frac{r-2}{r}} \, 2^{-n(r-2)-r} \, ,$$

mentre per le (21), (23), (24), (24′) si ha

$$\int_{A(k;\rho)} (w(x) - k)^2 \, dx_1 \dots dx_r = \sum_{n=1}^{\infty} \int_{(D_{n-1}-D_n)} (w(x) - k)^2 \, dx_1 \dots dx_r \leq \tag{28}$$

$$\leq \sum_{n=1}^{\infty} 2^{r-rn} (\lambda_n - \lambda_0)^2 \operatorname{mis} A(k;\varrho) \, .$$

Se ora indichiamo con θ il maggiore dei numeri

$$(\lambda_n - \lambda_{n-1})^2 \, 2^{-n(r-2)-r} \qquad (n = 1, 2, \dots) \tag{29}$$

avremo, per ogni intero positivo m,

$$(\lambda_m - \lambda_0)^2 = \left[\sum_{n=1}^{m} (\lambda_n - \lambda_{n-1}) \right]^2 \leq \theta m^2 2^{m(r-2)+r} \, , \tag{30}$$

mentre per le (27) si ha

$$[\operatorname{mis} A(k;\varrho)]^{\frac{2-r}{r}} \, \beta_1^2 \int_{A(k;\rho)} |\operatorname{grad} w|^2 \, dx_1 \dots dx_r \geq \theta \, . \tag{31}$$

Dalle (28), (30) segue

$$(32) \qquad \int_{A(k;\rho)} (w(x)-k)^2 dx_1 \dots dx_r \leqq \theta \operatorname{mis} A(k;\varrho) \sum_{n=1}^{\infty} n^2 2^{2(r-n)}$$

e quindi, qualora si ponga

$$(33) \qquad \beta_1^2 \sum_{n=1}^{\infty} 2^{2(r-n)} n^2 = \beta_2 ,$$

dalle (31), (32), (33) segue la (19).

Lemma IV. — Ad ogni numero positivo $\sigma < 1$ può associarsi un numero positivo $\theta(\sigma)$, tale che dalle

$$(34) \qquad \operatorname{mis} A(k;\varrho) < \varrho^r \theta(\sigma) , \qquad 0 < \varrho < \delta(\gamma) , \quad -\infty < k < +\infty$$

segua

$$(35) \qquad \operatorname{mis} A(k+\sigma c;\ \varrho - \sigma\varrho) = 0 ,$$

ove si è posto

$$(36) \qquad c = \varrho^{-\frac{r}{2}} [\theta(\sigma)]^{-\frac{1}{2}} \left[\int_{A(k;\rho)} (w(x)-k)^2 dx_1 \dots dx_r \right]^{\frac{1}{2}} .$$

Dim. Sia $\theta(\sigma)$ il più grande dei numeri θ che simultaneamente soddisfano le

$$(37) \qquad \operatorname{mis} I(\varrho - \sigma\varrho) \geqq 2\theta\varrho^r$$

$$(38) \qquad \theta \leqq \left| \frac{\sigma^2 2^{-(r+2)}}{1+\gamma+\beta_2} \right|^r ,$$

ove γ e β_2 sono le costanti che intervengono nella (1) del n. 1 e nella (19); supponendo verificate le (34), (36) dobbiamo provare che vale la (35) ed a tale scopo porremo

$$(39) \qquad \varrho_h = \varrho - \sigma\varrho + 2^{-h}\sigma\varrho , \qquad k_h = k + \sigma c - 2^{-h}\sigma c .$$

Per la 3ª) proprietà delle funzioni della classe $\mathfrak{B}(E;\gamma)$ (vedi n. 1), avremo

$$(40) \qquad \gamma 4^{h+1} \int_{A(k_h;\rho_h)} (w(x)-k_h)^2 dx_1 \dots dx_r \geqq \varrho^2\sigma^2 \int_{A(k_h;\rho_{h+1})} |\operatorname{grad} w|^2 dx_1 \dots dx_r ,$$

mentre per le (34), (37), (39) e per il lemma III si ha

$$\beta_2 \int_{A(k_h;\, \rho_{h+1})} |\operatorname{grad} w|^2 dx_1 \dots dx_r \, [\operatorname{mis} A(k_h;\, \varrho_h)]^{\frac{2}{r}} \geq \tag{41}$$

$$\geq \beta_2 \int_{A(k_h;\, \rho_{h+1})} |\operatorname{grad} w|^2 dx_1 \dots dx_r \, [\operatorname{mis} A(k_h;\, \varrho_{h+1})]^{\frac{2}{r}} \geq \int_{A(k_h;\, \rho_{h+1})} (w(x) - k)^2 dx_1 \dots dx_r \,.$$

Dalle (40), (41) segue

$$\beta_2 \gamma \sigma^{-2} \varrho^{-2} 4^{(h+1)} \, [\operatorname{mis} A(k_h;\, \varrho_h)]^{\frac{2}{r}} \int_{A(k_h;\, \rho_h)} (w(x) - k_h)^2 dx_1 \dots dx_r \geq \tag{42}$$

$$\geq \int_{A(k_h;\, \rho_{h+1})} (w(x) - k_h)^2 dx_1 \dots dx_r \geq \int_{A(k_{h+1};\, \rho_{h+1})} (w(x) - k_{h+1})^2 dx_1 \dots dx_r \,;$$

d'altra parte, essendo per le (39)

$$\int_{A(k_h;\, \rho_{h+1})} (w(x) - k_h)^2 dx_1 \dots dx_r \geq \sigma^2 c^2 4^{-(h+1)} \operatorname{mis} A(k_{h+1};\, \varrho_{h+1}) \,, \tag{43}$$

dalle (42), (43) segue

$$\sigma^4 c^2 \varrho^2 2^{-4(h+1)} \operatorname{mis} A(k_{h+1};\, \varrho_{h+1}) \leq \tag{44}$$

$$\leq \beta_2 \gamma \, [\operatorname{mis} A(k_h;\, \varrho_h)]^{\frac{2}{r}} \int_{A(k_h;\, \rho_h)} (w(x) - k_h)^2 dx_1 \dots dx_r \,.$$

Proviamo ora per induzione che, per ogni intero non negativo l, valgono le

$$\operatorname{mis} A(k_l;\, \varrho_l) \leq \varrho^r \theta(\sigma) 2^{-2rl} \,, \tag{45}$$

$$\int_{A(k_l;\, \rho_l)} (w(x) - k_l)^2 dx_1 \dots dx_r \leq \varrho^r \theta(\sigma) c^2 2^{-2rl} \,; \tag{46}$$

le (45), (46) per $l = 0$ sono immediata conseguenza delle (34), (36), (39); d'altra parte se le (45), (46) sono verificate per $l = h$, lo sono pure per $l = h + 1$ in virtù delle (38), (42), (44). Dalle (45) passando al limite per $l \to \infty$ e ricordando le (39) si ottiene la (35) e il lemma è dimostrato.

Osservazione I. — Poichè quando $w(x)$ appartiene alla classe $\mathfrak{B}(E;\gamma)$ vi appartiene anche la funzione $-w(x)$, accanto ai lemmi II, III, IV sussistono i lemmi analoghi in cui intervengono gli insiemi $B(k;\varrho)$ in luogo degli insiemi $A(k;\varrho)$.

Osservazione II. — Dal lemma IV si deduce che, per ogni numero positivo $p < \delta(y)$ l'oscillazione di $w(x)$ in $I(p)$ è finita (5). Infatti è sempre possibile trovare due numeri positivi ϱ, σ, che verifichino le

$$\varrho - \sigma\varrho = p\,, \qquad 0 < \varrho < \delta(y) \tag{47}$$

e scegliere poi k e c in modo che siano verificate le (34), (36) e quindi sia, in quasi tutto $I(p)$,

$$w(x) \leq k + \sigma c\,; \tag{48}$$

analogamente, per l'osservazione I, può stabilirsi una limitazione inferiore per $w(x)$.

Lemma V. — Esiste un numero $\eta > 0$ *tale che, per* $0 < 4\varrho < \delta(y)$, *si abbia sempre*

$$(1 - \eta)\operatorname{osc}(w;\, 4\varrho) \geq \operatorname{osc}(w;\, \varrho)\,, \tag{49}$$

ove osc $(w;\, \varrho)$ *è l'oscillazione di* $w(x)$ *in* $I(\varrho)$ (intesa nel senso precisato dal nota (5)).

Dim. Detti rispettivamente μ_1, μ_2 i veri estremi superiore ed inferiore di $w(x)$ in $I(4\varrho)$, poniamo

$$\operatorname{osc}(w;\, 4\varrho) = \mu_1 - \mu_2 = \omega,\ \bar{\mu} = \frac{\mu_1 + \mu_2}{2}\,; \tag{50}$$

per la definizione degli insiemi $A(k;\, \varrho)$, $B(k;\, \varrho)$ sarà certo verificata una delle due relazioni

$$2 \operatorname{mis} A(\bar{\mu};\, 2\varrho) \leq \operatorname{mis} I(2\varrho)\,, \tag{51}$$

$$2 \operatorname{mis} B(\bar{\mu};\, 2\varrho) \leq \operatorname{mis} I(2\varrho)\,. \tag{51'}$$

Supponiamo verificata la (51) e poniamo, per ogni numero positivo $\lambda \leq \dfrac{\omega}{4}$,

$$D(\lambda) = A(\mu_1 - 2\lambda;\, 2\varrho) - A(\mu_1 - \lambda;\, 2\varrho)\,; \tag{52}$$

per il lemma II e le (50), (51), (52) sarà

$$\beta_1 \int_{D(\lambda)} |\operatorname{grad} w|\, dx_1 \ldots dx_r \geq \lambda\, [\operatorname{mis} A(\mu_1 - \lambda;\, 2\varrho)]^{\frac{r-1}{r}}\,, \tag{53}$$

---

(5) Il termine oscillazione va naturalmente inteso nel senso della teoria dell'integrazione, come differenza fra il *vero estremo superiore di* $w(x)$ *in* $I(p)$ (cioè il più piccolo dei numeri λ per cui è mis $A(\lambda;\, p) = 0$) ed il *vero estremo inferiore* (cioè il più grande dei numeri λ per cui è mis $B(\lambda;\, p) = 0$).

mentre per la diseguaglianza di Schwarz sarà

$$(54)\qquad \left(\int_{D(\lambda)} |\operatorname{grad} w|\, dx_1 \dots dx_r\right)^2 \leq \operatorname{mis} D(\lambda) \int_{D(\lambda)} |\operatorname{grad} w|^2 dx_1 \dots dx_r .$$

Per la condizione 3^a) del n. 1 si ha poi

$$(55)\qquad \int_{D(\lambda)} |\operatorname{grad} w|^2 dx_1 \dots dx_r \leq \int_{A(\mu_1 - 2\lambda;\, 2\rho)} |\operatorname{grad} w|^2 dx_1 \dots dx_r \leq$$

$$\leq \frac{\gamma}{4\varrho^2} \int_{A(\mu_1 - 2\lambda;\, 4\rho)} (w(x) - \mu_1 + 2\lambda)^2 dx_1 \dots dx_r \leq \gamma \varrho^{-2} \lambda^2 \operatorname{mis} I(4\varrho)$$

e quindi per le (53), (54), (55) sarà

$$(56)\qquad \operatorname{mis} D(\lambda) \geq \frac{\varrho^2}{\beta_1^2 \gamma} [\operatorname{mis} A(\mu_1 - \lambda;\, 2\varrho)]^{\frac{2r-2}{r}} \cdot [\operatorname{mis} I(4\varrho)]^{-1} .$$

Prendiamo ora un intero n verificante la

$$(57)\qquad \left|\theta\left(\frac{1}{2}\right)\right|^{\frac{2r-2}{r}} n \varrho^{2r} > \gamma \beta_1^2 \operatorname{mis} I(4\varrho) \operatorname{mis} I(2\varrho) ,$$

ove $\theta\left(\frac{1}{2}\right)$ è la funzione che compare nelle (34), (36) calcolata per $\sigma = \frac{1}{2}$, e poniamo

$$(58)\qquad \eta = 2^{-(n+2)} ;$$

avremo allora

$$(59)\qquad \lambda \leq \frac{\omega}{4} \quad \text{per} \quad \lambda = 2^m \eta \omega , \quad m = 1, \dots, n$$

e quindi per le (56) sarà

$$(60)\qquad \operatorname{mis} D(2^m \eta \omega) \geq$$

$$\geq \frac{\varrho^2}{\beta_1^2 \gamma} [\operatorname{mis} A(\mu_1 - 2^m \eta \omega;\, 2\varrho)]^{\frac{2r-2}{r}} \cdot [\operatorname{mis} I(4\varrho)]^{-1} \geq$$

$$\geq \frac{\varrho^2}{\beta_1^2 \gamma} [\operatorname{mis} A(\mu_1 - 2\eta\omega;\, 2\varrho)]^{\frac{2r-2}{r}} \cdot [\operatorname{mis} I(4\varrho)]^{-1}$$

per $m = 1, \dots, n$.

Dalle (52), (60) segue

(61)
$$\operatorname{mis} I(2\varrho) \geq \sum_{m=1}^{n} \operatorname{mis} D(2^m \eta\omega) \geq$$
$$\geq n\,[\operatorname{mis} I(4\varrho)]^{-1} \frac{\varrho^2}{\gamma\beta_1^2} [\operatorname{mis} A(\mu_1 - 2\eta\omega; 2\varrho)]^{\frac{2r-2}{r}}$$

e quindi dalle (57), (61)

(62)
$$\operatorname{mis} A(\mu_1 - 2\eta\omega; 2\varrho) < \theta\left(\frac{1}{2}\right)\varrho^r < \theta\left(\frac{1}{2}\right)(2\varrho)^r .$$

Ricordando che μ_1 è il vero estremo superiore di $w(x)$ in $I(4\varrho)$, si ha per la (62)

(63)
$$\int_{A(\mu_1 - 2\eta\omega;\, 2\rho)} (w(x) - \mu_1 + 2\eta\omega)^2 dx_1 \dots dx_r < (2\varrho)^r (2\eta\omega)^2 \theta\left(\frac{1}{2}\right)$$

e quindi per il lemma IV

(64)
$$\operatorname{mis} A(\mu_1 - \eta\omega, \varrho) = 0 ,$$

cioè il vero estremo superiore di $w(x)$ in $I(\varrho)$ non supera $(\mu_1 - \eta\omega)$ e quindi vale la (49); alla stessa conclusione saremmo arrivati, per l'osservazione I, supponendo che invece della (51) fosse verificata la (51').

3. — I lemmi stabiliti nel n. 2 consentono la dimostrazione del seguente:

TEOR. I. — *Ogni funzione* $w(x)\mathcal{E}\mathfrak{B}(E;\gamma)$ *è uniformemente hölderiana in ogni insieme chiuso e limitato contenuto in* E [6].

Dim. Dall'osservazione II e dal lemma V del n. 2 si deduce che, per ogni punto $y\mathcal{E}E$, l'oscillazione di $w(x)$ nell'intorno $I(\varrho; y)$ è infinitesima per $\varrho \to 0$; ne seguono l'esistenza in ogni punto $y\mathcal{E}E$ del limite

(1)
$$\overline{w}(y) = \lim_{\rho\to 0}\left(\int_{I(\rho;\, y)} w(x) dx_1 \dots dx_r\, [\operatorname{mis} I(\varrho; y)]^{-1}\right)$$

e la continuità di $\overline{w}(x)$ in E.

---

[6] Al solito la frase va intesa nel senso della teoria dell'integrazione, cioè $w(x)$ è hölderiana essa stessa oppure esiste una funzione hölderiana quasi ovunque eguale a $w(x)$; analoghe considerazioni sono spesso sottintese nel corso di questa memoria (cfr. [1] nota [2]).

Poniamo ora

$$\alpha = -\log_4 (1 - \eta) , \tag{2}$$

ove η è la costante che compare nel lemma V e che, per le (58), (57), (38), (37), (33), (12) del n. 2. è indipendente dalla scelta del punto y in E. Fissati un insieme chiuso e limitato $C \mathcal{C} E$ ed un numero positivo p minore della distanza di C dalla frontiera E, consideriamo l'insieme L descritto dalla quantità

$$\frac{2|\overline{w}(x) - \overline{w}(y)|4^{\alpha}}{p^{\alpha}} \tag{3}$$

per

$$0 \leq |x - y| \leq p , \qquad y \mathcal{E} C , \tag{4}$$

ove $|x - y|$ è la distanza dei punti x, y.

Per la continuità di $\overline{w}(x)$ in E, l'insieme L avrà un massimo che indicheremo con τ e quindi, fissato un punto $y \mathcal{E} C$ avremo, riprendendo le notazioni del n. 2 e in particolare del lemma V,

$$\operatorname{osc}(w; \varrho) \leq \tau \varrho^{\alpha} \quad \text{per} \quad \frac{p}{4} \leq \varrho \leq p . \tag{5}$$

Ma, comunque si fissi un numero positivo $\varrho < \dfrac{p}{4}$, esisterà un intero m tale che si abbia

$$\frac{p}{4} \leq 4^m \varrho < p \tag{6}$$

e quindi, per il lemma V e le (2), (5), (6),

$$\operatorname{osc}(w; \varrho) \leq (1 - \eta)^m \operatorname{osc}(w; 4^m \varrho) \leq \tau \varrho^{\alpha} ; \tag{7}$$

data l'arbitrarietà di C ed y il teorema è dimostrato.

TEOR. II. — *Siano date r^2 funzioni $a_{hl}(x)$ quasi continue nel campo $E \mathcal{C} S_r$; sia sempre $a_{hl}(x) = a_{lh}(x)$ ed esistano due numeri positivi τ_1, τ_2 tali che, per ogni punto $x \mathcal{E} E$ e per ogni vettore $\lambda \equiv (\lambda_1, \ldots, \lambda_r)$ si abbia*

$$\tau_1 |\lambda|^2 \leq \sum_{h,l}^{1,r} a_{hl}(x) \lambda_h \lambda_l \leq \tau_2 |\lambda|^2 ; \tag{8}$$

sia poi $w(x)$ una funzione della classe $\mathfrak{A}^{(2)}(E)$ tale che, per ogni insieme chiuso e limitato $C \mathcal{C} E$ e per ogni funzione $g(x) \mathcal{E} \mathfrak{A}^{(2)}(E)$ ed identicamente nulla in $(E - C)$, si abbia

$$\sum_{h,l}^{1,r} \int_E \frac{\partial g}{\partial x_h} a_{hl}(x) \frac{\partial w}{\partial x_l} dx_1 \ldots dx_r = 0 . \tag{9}$$

Allora $w(x)\varepsilon\mathfrak{B}(E;\gamma)$, *con* $\gamma = \left(\frac{\tau_2}{\tau_1}\right)^2$, *e quindi è hölderiana in* E *per il teor. I.*

Dim. Fissati arbitrariamente un punto $y\varepsilon E$ ed un numero reale k, poniamo, riprendendo le notazioni usate nel n. 1,

$$
\begin{aligned}
\varphi(x) &= w(x) - k \qquad \text{per} \quad x\varepsilon A(k) \\
\varphi(x) &= 0 \qquad\qquad\quad \text{per} \quad x\varepsilon(E - A(k))\,;
\end{aligned} \tag{10}
$$

è facile constatare che $\varphi(x)$ appartiene ancora ad $\mathfrak{A}^{(2)}(E)$. Presi poi un numero positivo $p < \delta(y)$ ed una funzione $u(t)$ della variabile t continua con la derivata prima $u'(t)$ nell'intervallo $[0, +\infty]$, ed identicamente nulla in $[p, +\infty]$, poniamo

$$
f(x_1, \dots x_r) = u\left(\sqrt{(x_1 - y_1)^2 + \dots + (x_r - y_r)^2}\right); \tag{11}
$$

la funzione $\varphi(x) \cdot f(x)$ appartiene evidentemente alla classe $\mathfrak{A}^{(2)}(E)$ ed è identicamente nulla in $[E - I(p; y)]$; ne segue per la (9)

$$
\sum_{h,l}^{1,r} \int_E \frac{\partial(\varphi \cdot f)}{\partial x_h}\, a_{hl}(x)\, \frac{\partial w}{\partial x_l}\, dx_1 \dots dx_r = 0\,. \tag{12}
$$

Essendo $f(x)$ identicamente nulla in $[E - I(p; y)]$ dalle (11), (12) segue

$$
\begin{aligned}
\sum_{h,l}^{1,r} \int_0^p d\varrho \Bigg[u'(\varrho) \int_{\mathfrak{F}I(\rho; y)} n_h a_{hl}(x)\varphi(x)\, \frac{\partial w}{\partial x_l}\, d\mu_{r-1} \,+ \\
+\, u(\varrho) \int_{\mathfrak{F}I(\rho; y)} a_{hl}(x)\, \frac{\partial \varphi}{\partial x_h}\, \frac{\partial w}{\partial x_l}\, d\mu_{r-1} \Bigg] = 0\,,
\end{aligned} \tag{13}
$$

ove $n_1, \dots, n_r$ sono i coseni direttori della normale esterna ad $\mathfrak{F}I(\varrho; y)$ e $d\mu_{r-1}$ è l'elemento di misura $(r-1)$ dimensionale. Dalla (13) integrando per parti si ha

$$
\begin{aligned}
\sum_{h,l}^{1,r} \int_0^p d\varrho\, u'(\varrho) \Bigg[\int_{\mathfrak{F}I(\rho; y)} n_h a_{hl}(x)\varphi(x)\, \frac{\partial w}{\partial x_l}\, d\mu_{r-1} \,- \\
- \int_0^\rho dt \int_{\mathfrak{F}I(t; y)} a_{hl}(x)\, \frac{\partial \varphi}{\partial x_h}\, \frac{\partial w}{\partial x_l}\, d\mu_{r-1} \Bigg] = 0\,,
\end{aligned} \tag{14}
$$

quindi, per l'arbitrarietà di p ed $u(t)$ avremo, per quasi tutti i numeri positivi $\varrho < \delta(y)$,

$$
\int_{\mathfrak{F}I(\rho; y)} \sum_{h,l}^{1,r} n_h a_{hl}\varphi(x)\, \frac{\partial w}{\partial x_l}\, d\mu_{r-1} = \int_{I(\rho; y)} \sum_{h,l}^{1,r} a_{hl}\, \frac{\partial \varphi}{\partial x_h}\, \frac{\partial w}{\partial x_l}\, dx_1 \dots dx_r\,. \tag{15}
$$

Dalle (10), (15) si ha poi

$$(16) \qquad \int\limits_{A(k)\cdot\mathfrak{F}I(\rho;y)} \sum_{h,l}^{1,r} n_h a_{hl}(x)(w(x)-k)\frac{\partial w}{\partial x_l}\,d\mu_{r-1} =$$

$$= \int\limits_{A(k)I(\rho;y)} \sum_{h,l}^{1,r} a_{hl}(x)\frac{\partial w}{\partial x_h}\frac{\partial w}{\partial x_l}\,dx_1\dots dx_r\,,$$

da cui per la (8)

$$(17) \qquad \tau_2 \int\limits_{A(k)\mathfrak{F}I(\rho;y)} (w(x)-k)|\operatorname{grad} w|\,d\mu_{r-1} \geq \tau_1 \int\limits_{A(k)I(\rho;y)} |\operatorname{grad} w|^2 dx_1\dots dx_r\,.$$

Se ora poniamo

$$(18) \qquad \psi_1(\varrho) = \int\limits_{A(k)\mathfrak{F}I(\rho;y)} (w(x)-k)^2 d\mu_{r-1}\,,\quad \psi_2(\varrho) = \int\limits_{A(k)\mathfrak{F}I(\rho;y)} |\operatorname{grad} w|^2 d\mu_{r-1}\,,$$

dalle (17), tenendo presente la diseguaglianza di Schwarz, si ricava

$$(19) \qquad \sqrt{\psi_1(\varrho)\psi_2(\varrho)} \geq \frac{\tau_1}{\tau_2}\int_0^\rho \psi_2(t)dt\,;$$

posto $\gamma = \left(\frac{\tau_2}{\tau_1}\right)^2$, dalla (19), per un lemma di Caccioppoli-Leray (vedi [4] pag. 153), si ottiene

$$(20) \qquad \int_0^{\rho_1} \psi_2(\varrho)d\varrho \leq \frac{\gamma}{(\varrho_2-\varrho_1)^2}\int_0^{\rho_2} \psi_1(\varrho)d\varrho\,,$$

per $0 < \varrho_1 < \varrho_2 < \delta(y)$. Dalle (18), (20) segue subito la (1) del n. 1 e, poichè quando $w(x)$ soddisfa le ipotesi del teorema esse sono anche soddisfatte da $-w(x)$, è facile convincersi che vale anche la (1') del n. 1 e quindi

$$(21) \qquad w(x)\,\varepsilon\,\mathfrak{B}(E;\gamma)\,.$$

4. — Passiamo finalmente alla dimostrazione dell'annunciato teorema di analiticità e a tale scopo cominciamo col considerare una funzione $f(p) \equiv f(p_1, \dots, p_r)$ continua in S_r insieme alle sue derivate parziali prime e seconde; poniamo

$$(1) \qquad f_{hk}(p) = \frac{\partial^2 f}{\partial p_h \partial p_k}\,,\qquad f_h(p) = \frac{\partial f}{\partial p_h} \qquad (\text{per } h, k = 1, \dots, r)$$

e supponiamo che esistano due numeri positivi μ_1 e μ_2 tali che, per ogni punto $p \in S_r$ e per ogni vettore

$$\lambda \equiv (\lambda_1, \ldots, \lambda_r),$$

si abbia

$$\mu_1 |\lambda|^2 \leq \sum_{h,k}^{1,r} f_{hk}(p) \lambda_h \lambda_k \leq \mu_2 |\lambda|^2 . \tag{2}$$

Dati un campo $E \subset S_r$ ed una funzione $u^*(x) \in \mathfrak{A}^2(E)$, diremo che $u^*(x)$ *è estremale in* E *dell'integrale*

$$\mathfrak{J}[u] = \int f\left(\frac{\partial u}{\partial x_1}, \ldots, \frac{\partial u}{\partial x_r}\right) dx_1 \ldots dx_r \tag{3}$$

se, per ogni insieme chiuso e limitato $C \subset E$ e per ogni funzione $g(x)$ continua in E con le derivate parziali prime ed identicamente nulla in $(E - C)$ si ha

$$\sum_{h=1}^{r} \int_E \frac{\partial g}{\partial x_h} f_h\left(\frac{\partial u^*}{\partial x_1}, \ldots, \frac{\partial u^*}{\partial x_r}\right) dx_1 \ldots dx_r = 0 . \tag{4}$$

Vale allora il

TEOREMA III. — *Ogni estremale in* E *dell'integrale* $\mathfrak{J}[u]$ *ha le derivate parziali prime uniformemente hölderiane in ogni insieme chiuso e limitato contenuto in* E*: se poi* $f(p)$ *è analitica in* S_r*, ogni l'estremale è analitica in* E.

Dim. Per le (1), (2) le derivate prime di $f(p)$ soddisferanno una limitazione del tipo

$$|f_h(p)| \leq \mu_2 |p| + c \qquad (h = 1, \ldots, r) \tag{5}$$

ove $|p|$ è la distanza di p dall'origine delle coordinate e c è una costante positiva; poichè la nostra estremale $u^*(x)$ appartiene alla classe $\mathfrak{A}^{(2)}(E)$, anche le funzioni

$$f_h\left(\frac{\partial u^*}{\partial x_1}, \ldots, \frac{\partial u^*}{\partial x_r}\right)$$

avranno allora, al pari delle derivate di $u^*(x)$, quadrato sommabile in ogni insieme chiuso e limitato contenuto in E.

Ne segue, per noti teoremi sull'approssimazione lineare, che la (4) sarà verificata anche nel caso in cui $g(x)$ appartiene ad $\mathfrak{A}^{(2)}(E)$ ed è identicamente nulla al di fuori di un insieme chiuso e limitato contenuto in E.

Consideriamo ora un campo limitato $H \subset E$ avente distanza positiva dalla frontiera di E e siano σ un numero positivo minore di tale distanza, s un intero positivo non superiore ad r. Posto, per ogni intero positivo n,

$$u_n(x) = u^*\left(x_1, \ldots, x_s + \frac{\sigma}{n}, \ldots, x_r\right) \tag{6}$$

$u_n(x)$ appartiene evidentemente ad $\mathfrak{A}^{(2)}(H)$ e, per ogni insieme chiuso $C \mathsf{C} H$ e per ogni funzione $v(x) \mathcal{E} \mathfrak{A}^{(2)}(H)$ ed identicamente nulla in $(H - C)$, si ha

$$(7) \qquad \sum_{h=1}^{r} \int_{H} f_h \left(\frac{\partial u_n}{\partial x_1}, \ldots, \frac{\partial u_n}{\partial x_r} \right) \frac{\partial v}{\partial x_h} \, dx_1 \ldots dx_r = 0 \, .$$

D'altra parte, posto

$$(8) \qquad w_n^*(x) = u_n(x) - u^*(x) \, ,$$

anche $w_n^*(x)$ apparterrà ad $\mathfrak{A}^{(2)}(H)$ e sarà

$$(9) \qquad f_h \left(\frac{\partial u^*}{\partial x_1}, \ldots, \frac{\partial u^*}{\partial x_r} \right) - f_h \left(\frac{\partial u_n}{\partial x_1}, \ldots, \frac{\partial u_n}{\partial x_r} \right) + \sum_{k}^{1, r} a_{hk}^{(n)}(x) \frac{\partial w_n^*}{\partial x_k} = 0 \, ,$$

ove si è posto

$$(10) \qquad a_{hk}^{(n)}(x) = \int_0^1 f_{hk} \left(\frac{\partial u^*}{\partial x_1} + t \frac{\partial w_n^*}{\partial x_1}, \ldots, \frac{\partial u^*}{\partial x_r} + t \frac{\partial w_n^*}{\partial x_r} \right) dt \, .$$

Dalle (2), (10) si deduce, per ogni $x \mathcal{E} H$ e per ogni vettore λ,

$$(11) \qquad \mu_1 |\lambda|^2 \leq \sum_{h,k}^{1, r} a_{hk}^{(n)}(x) \lambda_h \lambda_k \leq \mu_2 |\lambda|^2 ,$$

mentre dalle (4), (7), (9) segue la

$$(12) \qquad \sum_{h, k}^{1, r} \int_{H} a_{hk}^{(n)}(x) \frac{\partial w_n^*}{\partial x_k} \frac{\partial v}{\partial x_h} \, dx_1 \ldots dx_r$$

per ogni funzione $v(x) \mathcal{E} \mathfrak{A}^{(2)}(H)$ ed identicamente nulla fuori di un insieme chiuso contenuto in H; per il teor. II possiamo allora asserire che $w_n^*(x)$ appartiene a $\mathfrak{B}(H; \gamma)$ con

$$(13) \qquad \gamma = \frac{\mu_2^2}{\mu_1^2} \, .$$

Apparterranno allora a $\mathfrak{B}(H; \gamma)$ anche le funzioni

$$w_n(x) = \frac{w_n^*(x) n}{\sigma}$$

e, poichè la successione

$$(14) \qquad w_1(x), \ldots, w_n(x), \ldots$$

converge in media verso $\frac{\partial u^*}{\partial x_s}$ nell'insieme H (che abbiamo supposto limitato ed avente distanza positiva dalla frontiera di E) per il lemma I

anche tale derivata appartiene a $\mathfrak{B}(H; \gamma)$. Data l'arbitrarietà con cui sono stati scelti il campo H e il numero s possiamo allora concludere che tutte le derivate prime di $u^*(x)$ appartengono a $\mathfrak{B}(E; \gamma)$: il loro carattere hölderiano segue allora dal teor. I e, nel caso in cui $f(p)$ sia analitica, $u^*(x)$ risulta tale per il teorema 9.2 di [6], che assicura l'esistenza delle derivate continue di qualsiasi ordine per le estremali di classe C', e per i risultati di Stampacchia e Hopf (vedi [9] teor. VII).

BIBLIOGRAFIA

[1] E. De Giorgi, *Sull'analiticità delle estremali degli integrali multipli.* « Rend. Lincei », Serie VIII, Vol. XX, Fasc. 4 (1956).

[2] E. Hopf, *Zum analytischen Charakter der Lösungen regulärer zweidimensionaler Variations-probleme.* « Math Zeitschrift », Band 30, pp. 404-413 (1929).

[3] E. Hopf, *Über den funktionalen, insbesondere den analytischen Charakter der Lösungen elliptischer Differentialgleichungen zweiter Ordnung.* « Math. Zeitschrift », Band 34, pp. 194-233 (1932).

[4] C. Miranda, *Equazioni alle derivate parziali di tipo ellittico.* Ed. Springer-Verlag, Berlino (1955).

[5] C. B. Morrey, *Multiple integral problems in the calculus of variations and related topics.* Univ. California. Publ. Math. (N. S.), Vol. I (1943).

[6] C. B. Morrey, *Second order elliptic systems of differential equations.* « Annals of Math. Studies », N. 33 Princeton Un. Press. (1954).

[7] M. Schiffman, *Differentiability and analyticity of solutions of double integral variational problems.* « Annals of Math. », Vol. 48 (1947).

[8] A. G. Sigalov, *On condition of differentiability and analiticity of solutions of two dimensional problems of the calculus of variations.* « Doklady Akad. Nauk. S.S.S.R. », (N. S.) 85 (1952) (« Mat Reviews », Vol. 14 n. 3).

[9] G. Stampacchia, *Sistemi di equazioni di tipo ellittico a derivate parziali del primo ordine e proprietà delle estremali degli integrali multipli.* « Ricerche di Matematica », Vol. I, pp. 200-226 (1952).

RICERCHE CHIMICO-FISICHE ED IMMUNOCHIMICHE SULLE PROTEINE, LIPOPROTEINE E LIPIDI SERICI E TISSURALI IN CONDIZIONI NORMALI E PATOLOGICHE

Memoria di C. Ambrosino, E. Borello, J. Liberatori
presentata dal Socio corrisp. Mario Milone
nell'adunanza del 29 Maggio 1957

Riassunto. — *Da alcuni anni presso l'Istituto di Chimica Fisica dell'Università di Torino sono stati avviati degli studi per la ricerca e la caratterizzazione chimico-fisica di componenti serici e tissurali, di importanza immunochimica, reperibili in corrispondenza di diversi stati patologici.*

Queste ricerche hanno condotto a risultati favorevoli per una forma virale di anemia caratteristica degli equini (Anemia Infettiva), e soprattutto nel campo delle neoplasie umane; in entrambe queste condizioni patologiche si sono potute caratterizzare ed isolare lipoproteine e lipidi serici e tissurali che dal punto di vista immunochimico esplicano un'attività antigenica utilizzabile a fini sierodiagnostici, mentre si è potuto nel contempo mettere in evidenza direttamente o indirettamente l'esistenza di componenti proteici a reattività « anticorpale ».

Tali risultati sono stati resi possibili da una più adeguata applicazione allo studio dei sistemi biologici di metodi chimico-fisici (in particolare dei componenti serici), quali ad esempio l'elettroforesi, la supercentrifugazione e la precipitazione frazionata per salatura, nonchè da nuove acquisizioni sui caratteri di solubilità in solventi organici dei lipidi serici e tissurali, e sulla loro composizione dedotta dallo studio degli spettri infrarossi. Proprio quest'ultimo mezzo di ricerca ha consentito di individuare nei lipidi serici normali e patologici precedentemente indicati delle nuove classi di lipoproteine e di lipidi, che si ritrovano in concentrazione maggiore nelle neoplasie e nell'Anemia Infettiva degli equini, che rappresentano un corredo comune ai sieri ed agli eritrociti di molte specie animali, e che sono inoltre contenuti in diversi antigeni lipidici di uso corrente in sierologia.

Queste nuove constatazioni di carattere chimico-fisico aprono quindi più vasti orizzonti all'attività immunochimica dei composti lipidici, particolarmente nell'individuazione precoce delle neoplasie, mentre costituiscono un primo passo per una più corretta valutazione delle possibilità e dei confini delle diagnosi sierologiche.

CAPITOLO I.

Ricerche chimico-fisiche sui componenti serici degli equini colpiti da A. I.

In una serie di lavori precedenti (1, 2, 3, 4, 5) avevamo riferito sui risultati di indagini chimico-fisiche intese a chiarire la particolare forma di reattività sierologica dei sieri degli equini colpiti da Anemia Infettiva (A. I.) quando venivano cimentati contro opportuni antigeni nella reazione di deviazione del complemento modificata (DDCM).

Abbiamo proseguito le ricerche in questo campo, e la nostra attenzione si è rivolta necessariamente a tutte quelle classi di composti serici, che nel decorso di questa infezione virale possono aver subito una evoluzione di composizione e di struttura tali da giustificare una reattività ed un particolare significato immunochimico.

Poichè sono state da noi riscontrate nelle neoplasie umane delle alterazioni del tutto analoghe a quelle constatate nell'A. I. e dei fenomeni di reattività sierologica (*) che si sono dimostrati anche qui in stretta concordanza con la diagnosi clinica, pur non volendo con ciò stabilire un parallelismo fra questi due stati patologici, ma per una miglior comprensione del lavoro sperimentale svolto in questi due campi, che verrà descritto in questo e nei capitoli seguenti, riteniamo utile far qui precedere una breve sintesi dei risultati sinora ottenuti nel campo dell'A. I., e in parte già pubblicati.

Un'indagine elettroforetica eseguita sui sieri di equini infetti (2, 3) aveva permesso di individuare un componente abnorme (c. a.) con mobilità compresa fra quella delle β- e delle γ- globuline (v. fig. 1), ed analogo quindi per comportamento elettrocinetico al componente « T » riscontrato da altri Autori (6, 7) in taluni sieri immuni e iperimmuni (tetano, difterite, ecc.). La presenza di questo componente nei diagrammi dei sieri di equini con A. I. è stata confermata anche dalle ricerche quasi contemporanee di Dreguss (8). Il c. a. da noi isolato elettroforeticamente, presentava reattività antigenica verso i sieri di portatori di A. I. (2, 3), mentre tale reattività non si riscontrava nel siero totale.

Lo stesso componente era reperibile anche negli estratti in tampone di milza infetta, ed è stato identificato attraverso misure di mobilità elettroforetica e in base all'attività sierologica.

(*) Tutti gli esami sierologici sono stati eseguiti dal dr. G. Guarini presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte e della Liguria diretto dal prof. A. Serra, mentre le consulenze di carattere clinico sono state fornite dal dr. P. Lovisetto dell'Istituto di Clinica Medica Generale e Terapia medica dell'Università di Torino diretto dal prof. P. Bastai.

Si era potuto inoltre constatare che l'attività di tale componente restava inalterata anche conservando per lungo tempo i sieri liofilizzati (9).

Per meglio chiarire questi fenomeni di reattività antigenica e per indagare contemporaneamente anche sulla reattività anticorpale, abbiamo intrapreso una caratterizzazione più fine delle proteine e lipoproteine seriche dei soggetti colpiti da A. I., cercando di definire le loro caratteristiche chimico-fisiche e conseguentemente le loro possibilità di isolamento.

A questo scopo ci è parso interessante studiare le condizioni di precipitabilità dei componenti dei sieri infetti con il metodo di « salatura »

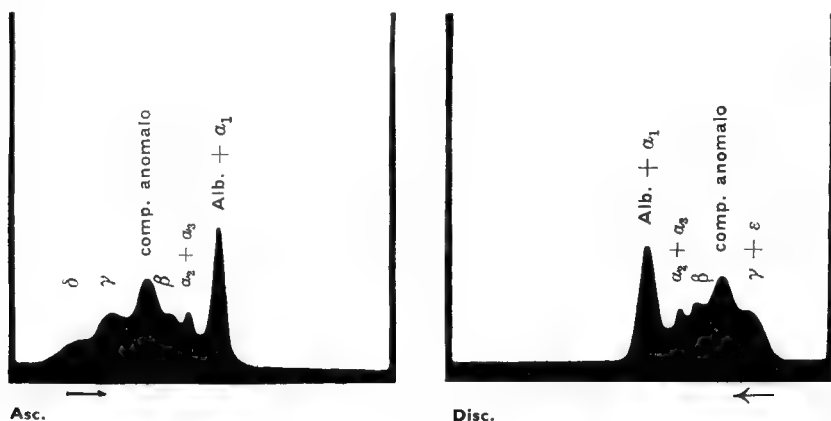



Fig. 1.

E_{188}. – Diagramma elettroforetico di un siero di equino colpito da anemia infettiva. – Tampone di fosfati pH 7,6. – Forza ionica 0,20. - Diluizione 1 : 5. – Cella analitica. – Temperatura 2,5 °C. – V. 85. – mA 10,5. – Registrazioni a 295'.

proposto da Derrien (10-19), che su sieri di bovini e di equini normali consente l'individuazione di un numero rilevante di componenti omogenei (da 20 a 36, a seconda delle modalità tecniche impiegate). Con il metodo di « routine » proposto da questo A. abbiamo precipitato progressivamente le proteine e lipoproteine dei sieri di equini con A. I. Il metodo consiste in aggiunte successive ai sieri di una soluzione 3,5 M di fosfati mono- e bipotassico a pH 6,5 ed alla temperatura di 24 °C. (4, 5), con incrementi di soluzione precipitante dell'1,2%. I surnatanti in equilibrio con ciascuna delle fasi precipitate sono stati analizzati per il loro contenuto in azoto con un micro-Kjeldahl (20); in fig. 2 presentiamo il diagramma ottenuto riportando i mg. di N_2/cc. in funzione della concentrazione di soluzione salina precipitante, C; in fig. 3 il corrispondente diagramma $-\frac{\Delta S}{\Delta C}$ in funzione di C (dove S è la quantità di N_2 del surnatante) ed in fig. 4 l'analogo diagramma ottenuto da Derrien per un siero di equino normale.

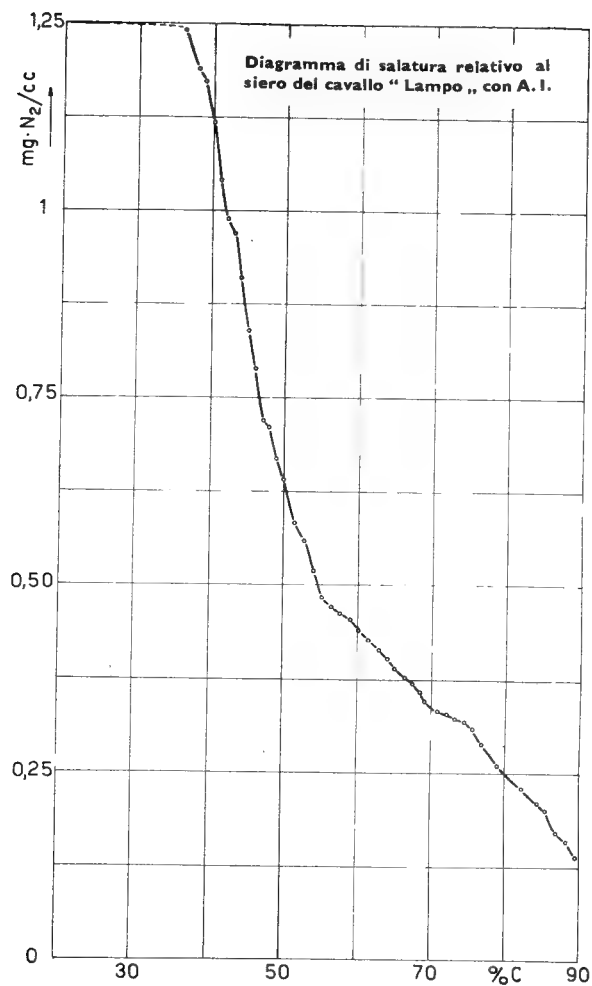



Fig. 2.

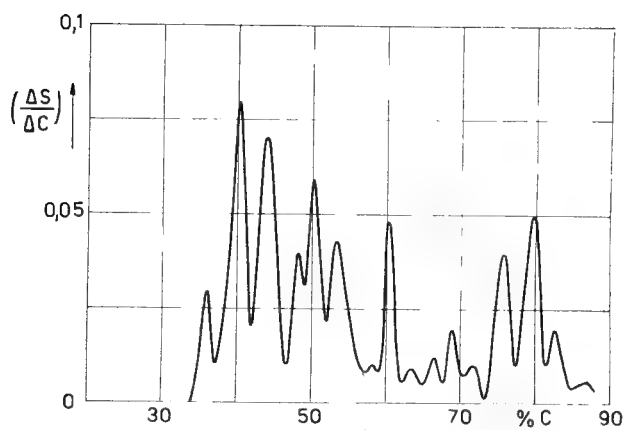



Fig. 3.

Diagramma di salatura relativo al siero del cavallo « Lampo » con A. I.

Si può osservare che, mentre dal punto di vista elettrocinetico, i diagrammi di questi sieri sono ben caratterizzati, come si è detto, dalla presenza di un componente abnorme omogeneo e con mobilità ben definita, al quale sono legate spiccate proprietà fissanti, i corrispondenti diagrammi di salatura presentano delle modificazioni rispetto al normale non facilmente interpretabili poichè interessano un gran numero di componenti, sia nella zona delle globuline (0-69%) come pure in quella delle albumine (69-90% circa).

Possiamo perciò osservare che i diagrammi di salatura, non presentando una modificazione caratteristica e ben definita del quadro proteico

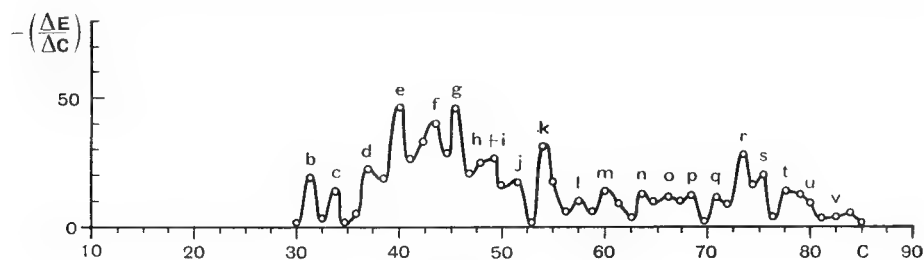



Fig. 4.

Diagramma di salatura del siero equino normale, ottenuto da Derrien e Coll. (24).

conseguente alla infezione virale per A. I., non suggeriscono alcuna utile indicazione in base alla quale iniziare uno studio immunochimico sui numerosi componenti (fino a 36) che si differenziano normalmente per questa via.

In base a questi risultati, confortati anche da altri dati sperimentali, avevamo formulato l'ipotesi che il componente elettroforetico abnorme potesse essere costituito da un complesso solubile antigene-anticorpo parzialmente saturo; tale interpretazione è in accordo con le esperienze di Baker e Coll. (21) sulla reattività sierologica riscontrata in un altro complesso antigene-anticorpo dopo trasporto elettroforetico a partire da un complesso saturo.

Avevamo inoltre avanzato l'ipotesi che sotto l'azione degli agenti precipitanti impiegati nel frazionamento per salatura il complesso potesse subire una dissociazione, caratteristica questa che ha già trovato applicazione per la dissociazione di precipitati specifici, che si formano alle ordinarie concentrazioni saline (22).

Abbiamo volutamente limitato le nostre osservazioni ad un esame unicamente qualitativo dei diagrammi di salatura nei casi di A. I., ed abbiamo esposto in base a questo criterio solo poche fra le molteplici e complesse osservazioni che secondo le più moderne acquisizioni possono

scaturire nel corso di ricerche su composti serici, proteici o lipoproteici, dotati di reattività sierologica.

Per quanto riguarda poi le frazioni a carattere anticorpale, in accordo con le più recenti nozioni sulle proprietà chimico-fisiche di questo particolare gruppo di colloidi serici, è noto che esse non possiedono caratteri di omogeneità così profondi da concretarsi in una rigorosa obbedienza all'equazione di Cohn e da risultare perciò, in diagrammi di salatura così dettagliati, come un unico componente. Tale equazione è infatti valida solo per sistemi monodispersi, e per questa ragione avanziamo talune riserve sulla possibilità e sull'utilità di comparare direttamente i diagrammi di salatura di proteine seriche normali con quelli di proteine sintetizzate in condizioni patologiche, confronto che permane di uso corrente.

In un lavoro più recente (23) Derrien e Coll. hanno descritto i risultati che si conseguono nella precipitazione frazionata dei sieri equini normali quando si allarghino gli intervalli di salatura (V. Tab. I), ed hanno inoltre

TABELLA I.

Ordine di precipitazione secondo Derrien e Coll. (23):

R (*)	*a*	*b*	*c*	*d*	*e*	*f*	*g*	*h*	*i*	*j*	*k*	*l*	*m*	*n*
E (**)		γ_1	γ_2		γ_3		$\beta_{1,2}$	γ_3	β_3	α_2	β_2	$\beta_{2,3}$	α_2	
R	*o*	*p*	*q*	*r*	*s*	*t*	*u*							
E	α_1		albumine											

(*) *R* = componenti ottenuti per salatura.
(**) *E* = componenti elettroforetici.

constatato per via elettroforetica la corrispondenza fra questi precipitati e ben precise frazioni elettroforetiche (24), secondo lo schema che riportiamo nella Tab. II.

TABELLA II.

Costituenti delle frazioni precipitate secondo Derrien e Coll. (24):

P (38%):	« aggregati », (*a*), *b*, *c*, *d* + *e*, *f*, *g*
P (38-40%):	*b* + *c*, *d*, *e*, *f*, *g*, *h*
P (40-43%):	*c*, *f*, *g*, *h*, (*i*)
P (43-49%):	*d*, (*e*), *f*, *g*, *h*, (*i*), *j*
P (52-61%):	(*i*), *j*, (*k*), *l*, *m* + *n*
P (61-69%):	*l*, *m* + *n*, *o*, *p*

Questo nuovo metodo presenta, a nostro avviso, un indubbio interesse, poichè, secondo le affermazioni degli AA., permette di stabilire delle relazioni fra componenti serici individuati con metodi chimico-fisici diversi, e consente nel contempo una più sollecita realizzazione del frazionamento senza limitazioni sulla entità del campione da utilizzare.

Nel caso particolare dei sieri di soggetti colpiti da A. I. una tale tecnica lasciava prevedere di poter fornire qualche indicazione circa l'intervallo di precipitazione del componente anomalo.

Poichè nei sieri degli equini colpiti da questa virosi, come si era controllato sierologicamente, esistevano frazioni a carattere antigenico e a carattere anticorpale, ci è parso interessante adottare questa nuova tecnica non solo per poter stabilire un confronto tra i componenti elettroforetici e le frazioni di salatura, ma soprattutto per poter iniziare uno studio delle reattività immunochimiche delle singole frazioni.

Per quest'ultimo motivo si è resa necessaria una rielaborazione della tecnica proposta da Derrien e che riportiamo schematicamente in Tab. III. La principale di tali modificazioni, che consiste nella precipitazione simultanea di più campioni di uno stesso siero, è determinata dalla necessità di effettuare il frazionamento nel minor tempo possibile, onde evitare profondi fenomeni di denaturazione, che potrebbero alterare non solo i risultati della precipitazione e quelli elettroforetici, ma soprattutto quelli immunologici di controllo.

Il siero da esaminare viene diluito 1 : 1 con una soluzione 0,2 M di NaCl e suddiviso in 6 campioni eguali (soluzioni I, II, III, IV, V e VI), che con opportune aggiunte di soluzione precipitante vengono portate rispettivamente al 38%, 40%, 43%, 49%, 52% e 61%; per effetto di tali aggiunte prendono origine i precipitati da a1p ad a6p ed i corrispondenti surnatanti da a1s ad a6s; questi ultimi vengono sottoposti ad una ulteriore precipitazione con fosfati, per effetto della quale si ottengono una nuova serie di precipitati (da b1p a b6p) ed una di surnatanti (da b1s a b6s); in tal modo si sono potute studiare e caratterizzare dal punto di vista immunologico ed elettroforetico le frazioni:

0-38%, 0-40%, 0-43%, 0-49%, 0-52% e 0-61%

i precipitati corrispondenti agli intervalli parziali:

38-40%, 40-43%, 43-49%, 49-52%, 52-61% e 61-69%

e tutti i relativi surnatanti.
(L'intervallo 0-90% non è stato ovviamente preso in considerazione, mentre è stato studiato dal punto di vista immunochimico ed elettroforetico l'intervallo 69-90% che corrisponde al surnatante b6s).

TABELLA III.

Schema di frazionamento delle proteine seriche.

Appare inoltre evidente che il tipo di frazionamento impiegato consente di ottenere il maggior numero di informazioni e di controlli sul siero di un unico soggetto; si può infatti osservare, ad esempio, che la frazione a6p deve possedere caratteristiche eguali alla somma di quelle delle frazioni parziali a1p, b1p, b2p, b3p, b4p e b5p. Ed inoltre le soluzioni b1s, b2s, b3s, b4s e b5s debbono avere composizione eguale rispettivamente alle frazioni a2s, a3s, a4s, a5s e a6s.

Nelle Tab. IV, V riportiamo i risultati sierologici ottenuti con la reazione di DDCM sulle frazioni di salatura dei sieri dei cavalli « Santhià » e « Lampo » (i cui sieri « in toto », prima del frazionamento, presentano

(1) Soluzione precipitante: fosfato mono- e bipotassico in quantità equimolecolari 3,5 M a pH 6,5.

Le concentrazioni sono espresse in vol. della soluzione precipitante su 100 cc. della soluzione finale.

Tutte le precipitazioni sono state eseguite a 24 °C., temperatura alla quale sono state mantenute le soluzioni dopo aggiunte della soluzione precipitante e prima della filtrazione.

TABELLA IV. — *Frazionamento ed esito degli esami sierologici delle frazioni ottenute dal siero infetto del cavallo « Santhià ».*

Soluz. I	→a1p antig.	+ +	+	+	→b1p antig.	+ +	+	+
	→a1s antic.	— +	— —	— + +	→b1s antic.	+ + + +	+ + + +	+ + + +
Soluz. II	→a2p antig.		+	+	→b2p antig.	+	+	—
	→a2s antic.	+ —	+	+	→b2s antic.	+ + +	+ +	+
Soluz. III	→a3p antig.	—	—	—	→b3p antig.	+ + —	+ +	+
	→a3s antic.				→b3s antic.	+ + +	+	+
Soluz. IV	→a4p antig.	+ + +		+	→b4p antig.	+	+	+
	→a4s antic.	—	—	—	→b4s antic.	+ + + +	+ + +	+ +
Soluz. V	→a5p antig.	— —	+	+	→b5p antig.		Anticomplem.	
	→a5s antic.	—	+	—	→b5s antic.		Anticomplem.	
Soluz. VI	→a6p antig.		Anticomplem.		→b6p antig.	+ +	+	+
	→a6s antic.		Anticomplem.		→b6s antic.		Anticomplem.	

TABELLA V. — *Frazionamento ed esito degli esami sierologici delle frazioni ottenute dal siero infetto del cavallo « Lampo ».*

Soluz. I	→a1p antig.	+	±	±	→b1p antig.	+	±	—
	→a1s antic.	++++	++++	++++	→b1s antic.	++++	+++	++
Soluz. II	→a2p antig.	+	+	±	→b2p antig.	+	±	±
	→a2s antic.	+++	++	—	→b2s antic.	+++	++	++
Soluz. III	→a3p antig.		non leggibile		→b3p antig.	—	—	—
	→a3s antic.	±	—	—	→b3s antic.	+++	++	+
Soluz. IV	→a4p antig.	++	+	+	→b4p antig.		Anticomplem.	
	→a4s antic.	—	—	—	→b4s antic.	++++	++	—
Soluz. V	→a5p antig.		Anticomplem.		→b5p antig.		Anticomplem.	
	→a5s antic.	—	—	—	→b5s antic.		Anticomplem.	
Soluz. VI	→a6p antig.		Anticomplem.		→b6p antig.		Anticomplem.	
	→a6s antic.	—	—	—	→b6s antic.		Anticomplem.	

rispettivamente reazione di DDCM negativa e reazione fortemente positiva per anticorpi liberi) impiegando i precipitati della serie a—p e b—p come antigeni contro sieri di animali sicuramente infetti per A. I., mentre i surnatanti delle serie a-s e b-s sono stati saggiati per il loro contenuto anticorpale contro antigeni sicuramente efficienti.

I dati sierologici indicati in queste tabelle accanto ai precipitati con attività antigenica esprimono l'intensità della reazione riscontrata, contro un siero positivo, alle seguenti diluizioni: 1 : 3, 1 : 4, 1 : 5; mentre per i surnatanti a reattività anticorpale esprimono l'intensità di reazione, verso un antigene « standard », alle diluizioni 1 : 10, 1 : 15, 1 : 20.

L'esame di queste due tabelle rivela come sia possibile con questo metodo di salatura isolare contemporaneamente da uno stesso siero infetto frazioni a carattere antigenico ed altre a carattere anticorpale. Questo risultato presenta un interesse particolare proprio nel caso del cavallo « Santhià », poichè permette di portare un contributo all'interpretazione di sierodiagnosi falso-negative, essendosi potuto in tal modo dimostrare che il silenzio sierologico di questo soggetto, e non infrequente negli stadi cronici della malattia, è dovuto alla formazione « in vivo » di un complesso antigene-anticorpo completamente saturo.

Una significativa documentazione sperimentale su questo punto era già stata presentata alla riunione annuale dell'Office International des Epizooties (O.I.E.) tenutasi a Parigi nel maggio 1956 (5); in seguito ad ulteriori conferme sperimentali l'argomento è stato da noi successivamente ripreso in due lavori (25, 26), in uno dei quali si discute ampiamente sulle possibilità del metodo, mentre nell'altro si riferisce sulle ultime modificazioni della tecnica sierodiagnostica. In questi lavori avevamo anche accertato che lo stesso sistema di frazionamento consentiva di isolare da sieri di soggetti sicuramente sani piccole quantità di lipoproteine a carattere antigenico, mentre mancavano assolutamente gli anticorpi reattivi (V. Tab. VI).

Un primo controllo dei sieri « Santhià » e « Lampo » sui quali doveva effettuarsi il frazionamento per « salatura » è stato eseguito mediante elettroforesi in fase libera con apparecchio della Klett Mfg. Co. nelle seguenti condizioni di esperienza:

diluizione 1 : 4. Tampone fosfati a pH 8,05 e $\mu = 0{,}20$
cella analitica da 11 cc.
temperatura 2 °C
V 120 – mA 12,5.

Riportiamo nelle figg. 5 e 6 i diagrammi ottenuti: in essi è chiaramente visibile la presenza del c. a., in quantità diverse nei due sieri, e particolarmente abbondante per il cavallo « Santhià », il cui siero si dimostra peraltro,

TABELLA VI.

Frazionamento ed esito degli esami sierologici delle frazioni ottenute dal siero sano del cavallo « Sandro ».

	→a1p antig.	—	—	—				
Soluz. I					→b1p antig.	—		—
	→a1s antic.	—	—					
					→b1s antic.	—	-	—
	→a2p antig.	—	-	-				
Soluz. II					→b2p antig.	.	—	—
	→a2s antic.	—	-	.				
					→b2s antic.	—	.	—
	→a3p antig.		aspecifica					
Soluz. III			-		→b3p antig.	—	.	. .
	→a3s antic.	—	—	—				
					→b3s antic.	—	-	—
	→a4p antig.		—					
Soluz. IV					→b4p antig.		-	.
	→a4s antic.	—	—	-				
					→b4s antic.	—	-	—
	→a5p antig.	—	—	—				
Soluz. V					→b5p antig.	—	—	—
	→a5s antic.	—	—	—				
					→b5s antic.	—		—
	→a6p antig.	—	-					
Soluz. VI					→b6p antig.	—	—	-
	→a6s antic.	—	—	.				
					→b6s antic.	-	—	—

alla salatura, fortemente dotato di frazioni a reattività antigenica ed anticorpale.

Nelle Tab. VII, VIII, IX, X riportiamo i diagrammi elettroforetici relativi alle frazioni di salatura dei sieri degli stessi due soggetti, ottenuti con apparecchio per microelettroforesi secondo Antweiler (27) nelle seguenti condizioni:

tampone fosfati pH 8,05 — μ 0,20
temperatura 14,5 °C.
V. 150 — mA 1,5
tempo di elettroforesi 20'.

L'impiego del micrometodo si è dimostrato indispensabile per questo tipo di indagine, anche se non fornisce delle ottime risoluzioni.

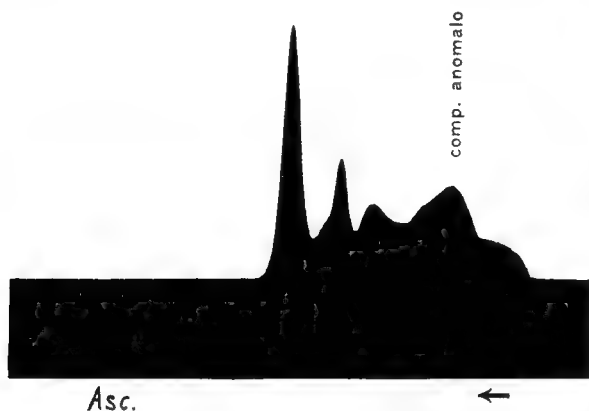



Fig. 5.

Diagramma elettroforetico di un siero di equino colpito da A. I. (Santhià). Tampone di fosfati a pH 8,05 e forza ionica 0,2. – Diluizione 1 : 4. – Cella analitica. – Temperatura 2 °C. – V. 120. – mA 12,5. – Tempo di registrazione 255'.

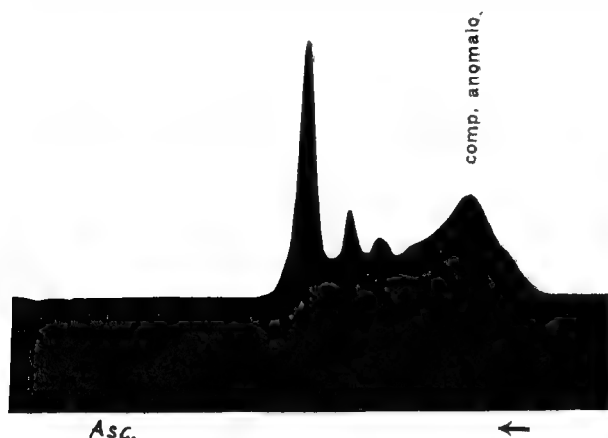



Fig. 6.

Diagramma elettroforetico di un siero di equino colpito da A. I. (Lampo). Tampone di fosfati a pH 8,05 e forma ionica 0,2. - Diluizione 1:4. – Cella analitica. – Temperatura 2 °C. – V. 120. – mA 12,5. – Tempo di registrazione 161'.

I diagrammi delle Tab. VII, VIII riguardano i precipitati della serie a-p e della serie b-p, mentre nelle Tab. IX e X sono riportati i diagrammi delle serie a-s e b-s.

Uno sguardo d'insieme permette quindi di ritenere sufficientemente rispettata anche nei sieri di portatori di A. I., la successione di precipitazione prevista da Derrien per il siero equino normale (V. Tab. I e II).

TABELLA VII.

Diagrammi elettroforetici sulle frazioni di salatura del siero del cavallo « Santhià » con A. I.

c.a.
a1p p(0-38 %)

c.a.
b1p p (38-40 %)

c.a.
a2p p(0-40 %)

c.a.
b2p p (40-43 %)

c.a.
a3p p (0-43 %)

c.a.
b3p p (43-49 %)

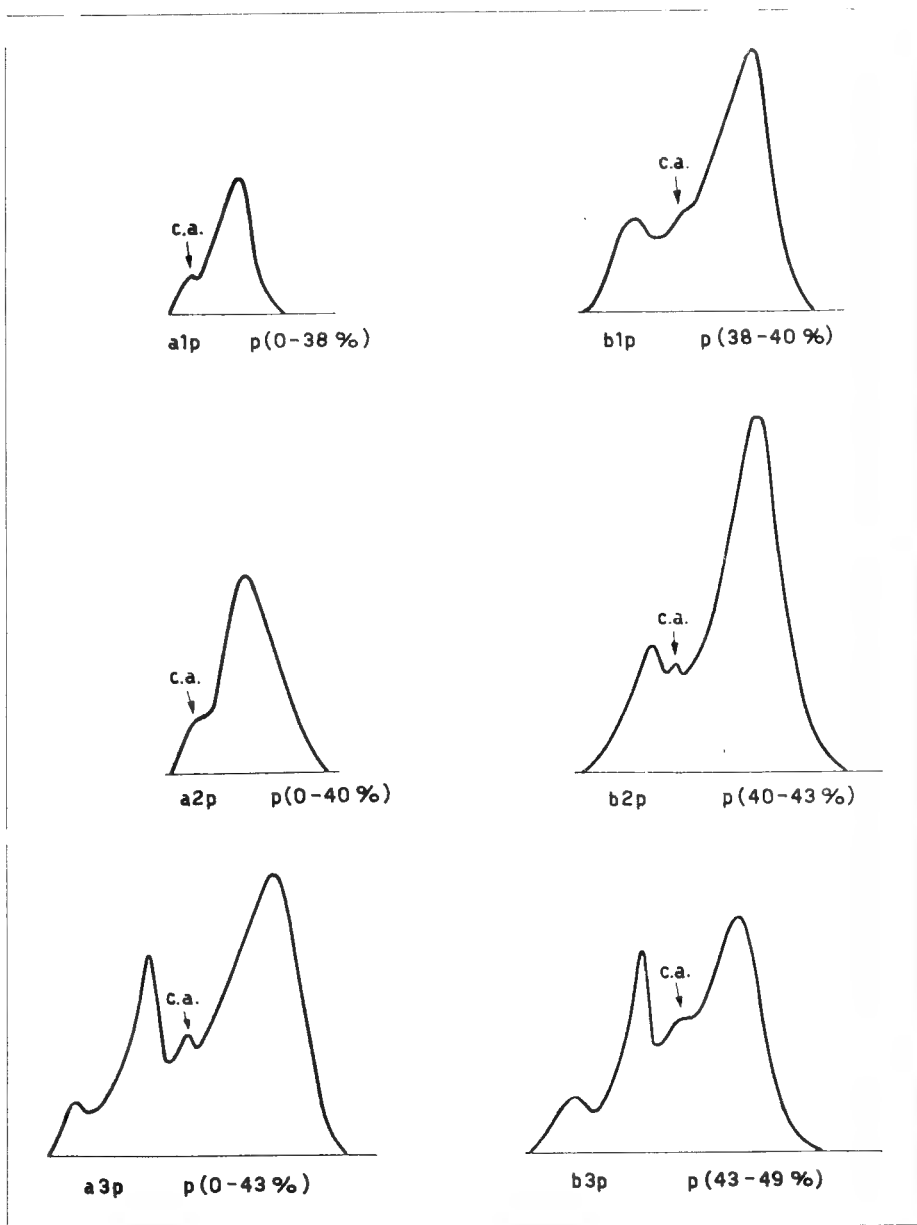



TABELLA VIII.

Diagrammi elettroforetici sulle frazioni di salatura del siero del cavallo « Santhià » con A. I.

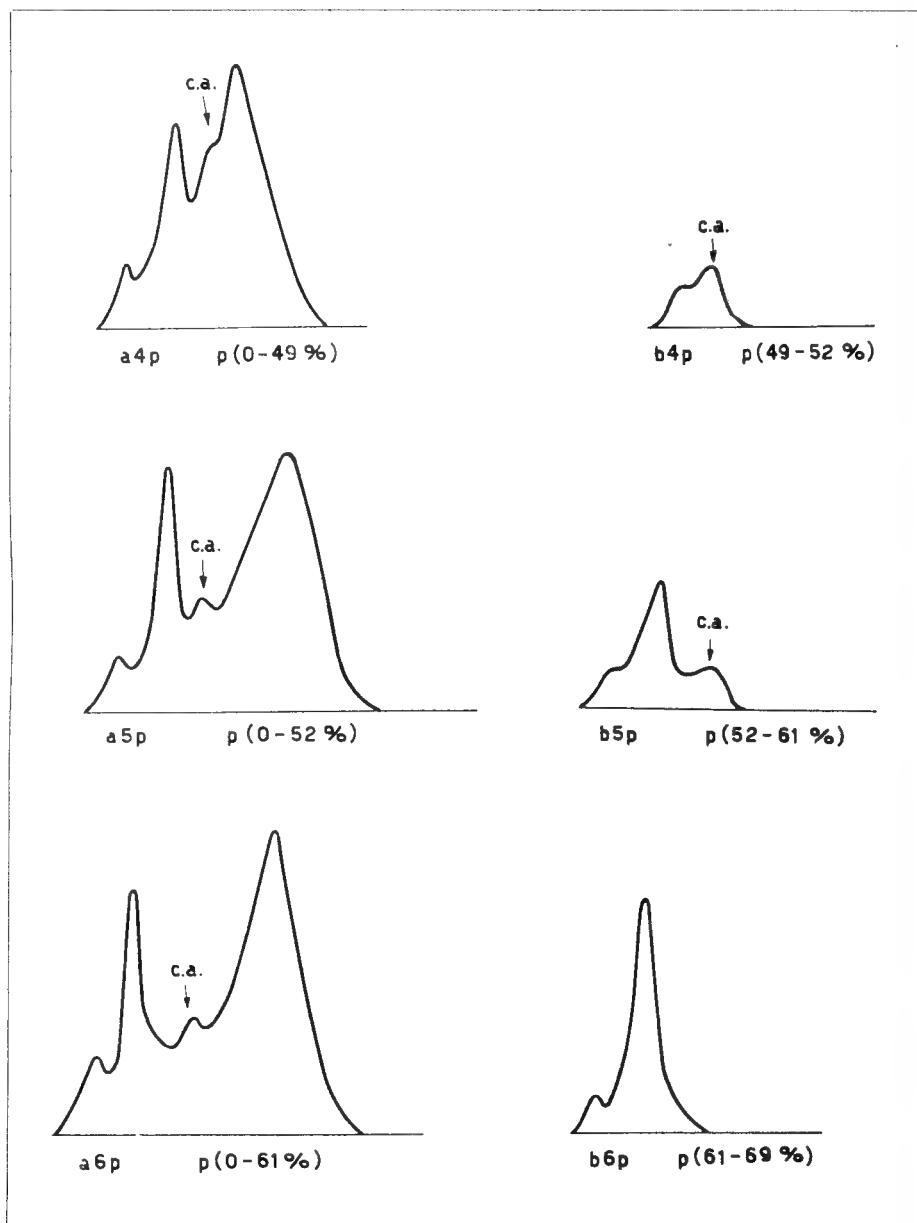
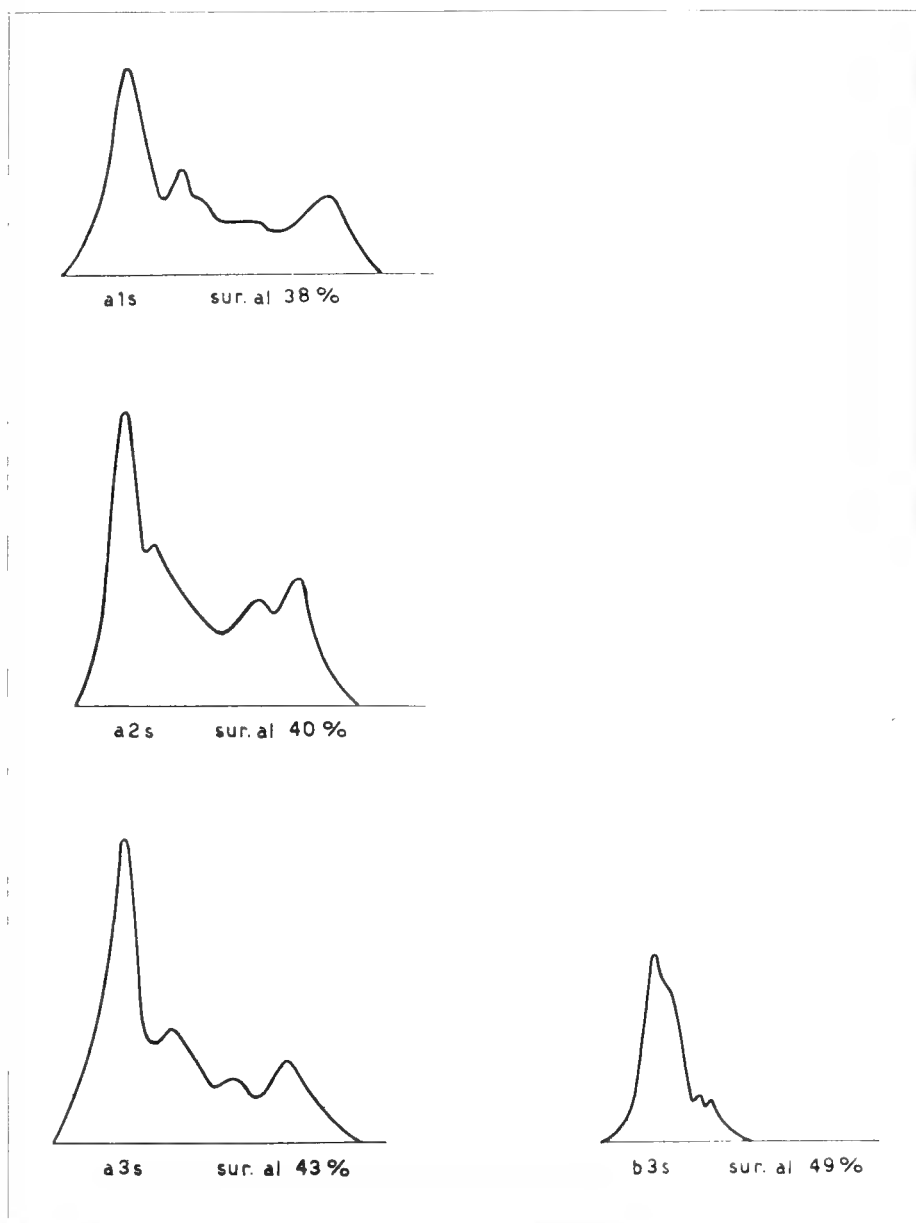



TABELLA IX.

Diagrammi elettroforetici sulle frazioni di salatura del siero del cavallo « Lampo » con A. I.

Abbiamo pertanto iniziato con un esame spettroscopico nell'infrarosso, poichè tale regione spettrale, normalmente molto ricca di assorbimenti caratteristici di gruppi funzionali o addirittura dell'intero scheletro molecolare, offriva le maggiori probabilità di giungere ad una differenziazione attraverso la caratterizzazione dei loro componenti chimici.

Siamo a conoscenza di un unico lavoro di spettroscopia infrarossa su lipoproteine seriche e relativi lipidi (44). In esso vengono riportati gli spettri di alcune lipoproteine isolate dal siero umano mediante ultracentrifugazione, con un procedimento descritto da Lindgren, Elliott e Gofman (45). L'assorbimento infrarosso ne conferma la natura: sono infatti presenti sia la banda a circa 5,8 μ caratteristica del gruppo carbonilico degli esteri (gliceridi, esteri colesterilici, e certi fosfolipidi tra cui le lecitine) sia le bande caratteristiche delle amidi a circa 6,1 μ (prima banda delle amidi) ed a 6,5 μ (II banda delle amidi). È interessante osservare come per i componenti caratterizzati da valori di S_f crescenti cresca il rapporto tra l'intensità della banda carbonilica e l'intensità delle bande amidiche. È questa l'osservazione più importante che può venire ricavata dallo studio dello spettro totale delle lipoproteine separate per questa via, sebbene gli AA. facciano ancora alcuni raffronti tra le frazioni ottenute per ultracentrifugazione ed altri prodotti di varia provenienza quali le β_1 lipoproteine ottenute col frazionamento secondo Cohn, la dimiristoillecitina sintetica, le lecitine dell'uovo, la sfingomielina, il palmitato di colesterolo.

Per interpretare gli assorbimenti non chiaramente assegnabili a determinati gruppi di atomi gli AA. hanno successivamente studiato gli spettri infrarossi ottenuti dalle lipoproteine con estrazioni frazionate mediante solventi organici (nell'ordine: acetone, alcool + cloroformio nel rapporto 1 : 1) confrontandoli con gli spettri di alcuni costituenti fondamentali dei lipidi.

Gli spettri di questi estratti sono stati esaminati in soluzione di solfuro di carbonio.

L'acetone secondo gli AA. estrae i grassi, gli esteri colesterilici e il colesterolo mentre la miscela alcool + cloroformio (1 : 1) estrae i fosfolipidi (lecitine).

Poichè gli spettri dei grassi, degli esteri colesterilici e delle lecitine non risentono molto nelle loro caratteristiche principali della costituzione chimica, è possibile scegliere alcuni assorbimenti tipici atti a rivelare la presenza di queste classi di composti nelle miscele.

Gli AA. propongono quindi i seguenti assorbimenti per l'individuazione dei componenti principali dei lipidi estratti dalle lipoproteine (v. Tabella XII).

TABELLA X.

Diagrammi elettroforetici sulle frazioni di salatura del siero del cavallo « Lampo » con A. I.

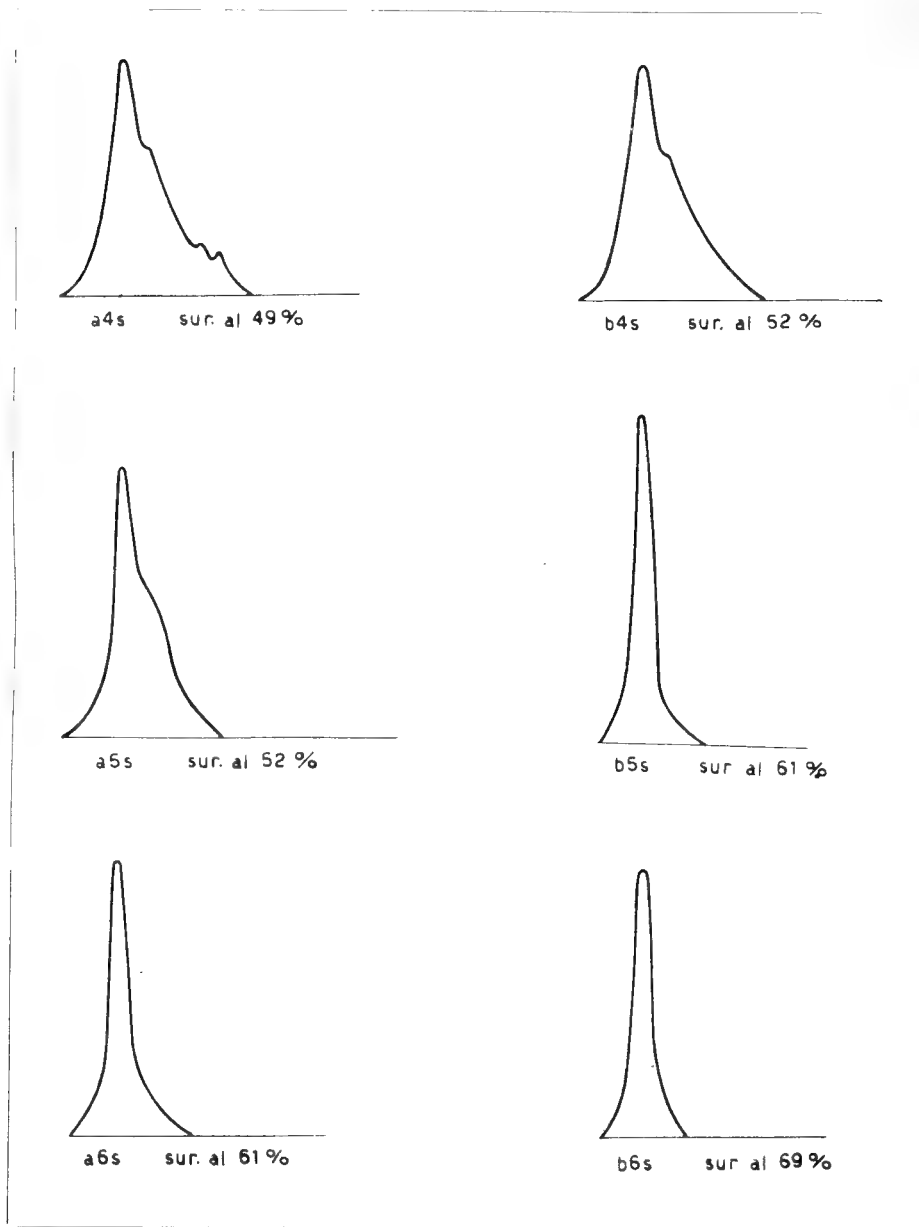



TABELLA XII.

	Lunghezza d'onda in μ	Assegnazione
	3	proteine, fosfolipidi (colesterolo)
(*)	3,4-3,5	
	5,8	grassi, esteri colesterilici, fosfolipidi
	6,1	proteine
	6,5	»
(*)	6,8	
(*)	7,25	
	8,1	fosfolipidi
	8,55	esteri colesterilici
	8,65	grassi e lecitine
	9,2-9,4	fosfolipidi
(1)	9,5	colesterolo
	10,3	lecitine
	13,8	grassi, esteri colesterilici, fosfolipidi

Spettri I. R. degli estratti lipidici totali dal siero di cavalli sani.

Descriviamo ora gli spettri dei lipidi estratti col procedimento indicato (solfuro di carbonio + acetone) dal siero di cavallo sano.

Gli spettri sono stati tutti registrati sugli estratti tal quali depositando su una piastrina di cloruro sodico, mediante una spatolina, la sostanza con uno spessore tale da dare una trasmissione di circa il 10-15% per la banda carbonilica a 5,8 μ. La sostanza di aspetto « grasso » dava dei depositi omogenei e praticamente esenti da luce diffusa. Lo spettrofotometro usato era un Perkin Elmer mod. 12-C modificato in modo da eliminare gli assorbimenti dell'anidride carbonica e dell'umidità atmosferica (45 bis).

Nella figura 7 sono riportate le curve di trasmissione di un estratto totale tipico prima e dopo di essere ripreso con cloroformio (ultima fase nello schema di estrazione riportato nella tabella XI).

Nel primo caso sono ancora presenti le bande a 6,1 e 6,5 μ caratteristiche delle amidi, le quali scompaiono dopo estrazione con cloroformio.

Che tali assorbimenti siano dovuti ad una lipoproteina è confermato, oltre che dalla presenza di un notevole assorbimento a circa 3 μ (NH), che diminuisce d'intensità nell'estratto cloroformico, dalle analogie con gli spettri delle lipoproteine S_f 6 e S_f 40-100, nonchè delle β_1 lipoproteine di Cohn e delle lipoproteine dall'uovo riportate da Freeman e Coll.

(*) Gli assorbimenti segnati con asterisco sono caratteristici di tutte le classi di composti sopra elencati.

(1) L'assorbimento del colesterolo a 9,5 μ non è risolvibile da quello dei fosfolipidi a 9,4 μ se questi sono presenti in notevole percentuale.

Si è inoltre confermato che il c. a. non segue rigorosamente nella precipitazione l'equazione di Cohn poichè non si ritrova in un solo intervallo di salatura: infatti nei diagrammi riportati la sua concentrazione relativa va aumentando a partire dal precipitato a1p per raggiungere un massimo in a4p, frazione che dimostra anche la reattività antigenica più elevata, e decresce poi nelle successive frazioni.

Lo stesso fatto si verifica anche nella serie a-s del cavallo « Lampo ».

La precipitazione frazionata per salatura mette inoltre in evidenza una maggiore omogeneità delle frazioni a carattere anticorpale che scompaiono regolarmente dai surnatanti alla concentrazione del 61%.

Questi fatti costituiscono una ulteriore indicazione che il componente anomalo è costituito da un complesso antigene-anticorpo ($Ag_x - Ab_y$), che per effetto delle variazioni di concentrazione salina può subire dissociazioni più o meno profonde con variazioni del rapporto $\left(\frac{Ag_x}{Ab_y}\right)$ come è stato riscontrato da Haurowitz e Coll. su altri tipi di complessi (28).

Sulla costituzione del particolare complesso antigene-anticorpo da noi riscontrato nei sieri di A. I. torneremo in seguito, quando avremo assunto un maggior numero di informazioni di carattere chimico-fisico su questo sistema. Sulla scorta dei risultati acquisiti si possono per ora formulare le seguenti ipotesi: il complesso antigene-anticorpo dell'A. I. è formato da anticorpi univalenti non precipitanti, ed in tal caso la quantità di c. a. osservata per elettroforesi sarebbe in stretta relazione con quella che è la risposta immunochimica del soggetto all'infezione per A. I.; oppure il fenomeno elettrocinetico osservato è determinato dalla formazione « in vivo » di un sistema Antigene-anticorpi precipitanti reso solubile da un eccesso di antigene, come lascerebbero supporre gli esami sierologici sulle frazioni del cavallo « Santhià », nel cui siero non esistono anticorpi liberi. Rimarrebbe invece scartata l'ipotesi di una possibile dissociazione « in vivo » di un complesso insolubile

$$Ag_xAb_y \text{ (insolub.)} \rightleftarrows Ag_xAb_{y-z} \text{ (insolub.)} + Ab_z$$

poichè soprattutto nella fase cronica della malattia può verificarsi il fatto che non si trovino nei sieri anticorpi liberi (con conseguente silenzio sierologico), mentre da essi si sono sempre potute isolare quantità più o meno rilevanti di lipoproteine antigeniche.

Pur essendo importantissima per la definizione di questa forma virale una caratterizzazione degli anticorpi reattivi, per ragioni sperimentali dimostratesi non meno importanti, quale ad esempio il rapido allestimento di antigeni a titolo costante per l'individuazione di soggetti sicuramente infetti, si è imposta la necessità di fissare inizialmente l'attenzione sulle lipoproteine che, come si è visto avevano dimostrato reattività antigenica,

ed in particolare sul loro contenuto lipidico. Il comportamento immunochimico di questa particolare classe di composti, che si era già rivelato idoneo ad una differenziazione dei soggetti sani da quelli colpiti da A. I., lasciava inoltre intravvedere la possibilità di portare un chiarimento a talune interferenze di reattività sierologica riscontrate da Ishii, Tanaka e Sonoda in estratti lipidici di soggetti sicuramente sani o in diverse condizioni patologiche (e da noi constatate anche in talune lipoproteine del siero del cavallo sano « Sandro ») nonchè su alcuni casi di reattività antigenica di un estratto lipidico ottenuto dagli stessi sperimentatori da milza infetta e cimentato contro sieri di soggetti immuni (29).

L'estrazione di lipidi a reattività antigenica da impiegare nella sierodiagnosi dell'A. I. è stata da noi realizzata sfruttando una precedente sperimentazione rivolta a studiare i fenomeni di denaturazione termica delle proteine e lipoproteine seriche in presenza di alcoli polivalenti. Si è potuto così accertare che il glicole etilenico, da noi studiato in modo particolare, è in grado di estrarre dai sieri liofilizzati di animali colpiti da A. I. particolari classi di lipidi a carattere antigenico. Poichè questi alcoli esplicano nei confronti delle proteine e lipoproteine seriche una funzione piuttosto complessa, torneremo sull'argomento in un prossimo lavoro.

Estrazione e determinazione dei lipidi serici totali.

Per le ragioni esposte in precedenza si è reso necessario estendere il campo delle ricerche ai lipidi serici totali di soggetti normali e di soggetti colpiti da A. I. per accertare se i fenomeni di reattività antigenica fossero dovuti alla comparsa nei sieri, in corrispondenza di quello stato patologico, di particolari componenti chimici, oppure se tale reattività fosse invece dovuta ad una variazione delle concentrazioni relative dei lipidi presenti nei sieri normali.

Siamo a conoscenza delle difficoltà che presenta il problema dell'isolamento e della successiva determinazione dei lipidi serici e tissurali, come stanno a testimoniare i numerosi lavori di Macheboeuf e della sua scuola (30, 31), e di molti altri Autori, che ci è qui impossibile menzionare singolarmente.

Per quanto riguarda in particolare l'estrazione totale dei lipidi serici, le difficoltà che si incontrano sono determinate dalla notevole eterogeneità delle loro proprietà chimiche e chimico-fisiche, come pure dal loro stato nel sistema biologico, ed i diversi metodi di estrazione, che si fondano generalmente sull'azione di solventi, possono per tali ragioni non condurre ad un isolamento quantitativo.

Accanto a queste difficoltà di estrazione, altre ne sorgono quando si passi al successivo stadio della separazione delle diverse classi di

lipidi, od anche quando si voglia raggiungere un adeguato grado di purezza degli estratti totali.

Abbiamo sottoposto ad un esame critico i diversi metodi proposti da Macheboeuf (30, 31), Bloor (32, 33, 34), Bang (35), Monasterio (36, 37, 38), Campana (39), Lorenzini (40), Sperry e Brand (41), Monasterio e Gigli (42).

Per gli scopi della nostra ricerca ci è parso particolarmente adatto quello proposto da Monasterio e Gigli nel 1947 e che consente secondo gli AA. delle determinazioni riproducibili e costanti del contenuto lipidico di un siero.

Il metodo consiste in una estrazione del siero con alcooletere (3 : 1), seguendo sostanzialmente in questo il sistema di Bloor, e nel determinare nell'estratto i lipidi per ossidazione con dicromato d'argento.

Abbiamo inizialmente applicato questo metodo all'estrazione dei lipidi dai sieri equini sani e da quelli di soggetti colpiti da A. I.

Mentre i risultati sui soggetti normali riproducono i valori riportati dagli AA. citati, nei soggetti con A. I. si è riscontrato per questa via un costante aumento del contenuto lipidico che si può valutare in 80 mg. per cento, fatto questo che ricondurrebbe l'A. I. degli equini nel quadro più generale di altre forme di anemia, caratterizzate appunto da un aumento del contenuto lipidico.

Frazionamento dei lipidi serici.

Accanto alle determinazioni quantitative abbiamo preso in considerazione un frazionamento dei lipidi totali ottenuti con questo metodo utilizzando le loro caratteristiche di solubilità in solventi organici diversi. Non ci siamo limitati alla separazione dei grassi neutri del colesterolo, lecitine, cefaline, sfingomieline e cerebrosidi, ma, sulla traccia di metodi più complessi elaborati da alcuni AA. (43), abbiamo cercato di ottenere una ulteriore e più significativa separazione delle singole classi di composti che costituiscono il corredo lipidico totale, fissando in particolare la nostra attenzione sui lipidi a reattività antigenica.

Riportiamo schematicamente il procedimento seguito nella tabella a pagina seguente.

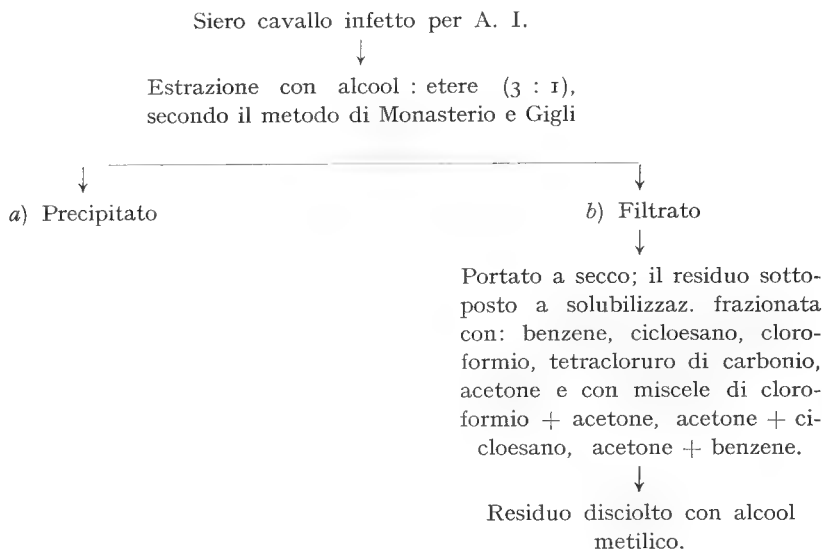
Si è subito osservato che mentre il filtrato *b*) presenta una reattività antigenica limitata e non costante, alcune delle frazioni da esso ottenute con i solventi indicati presentano una reattività spiccatissima e superiore a quella dell'estratto totale di partenza.

Per accertare se il sistema alcool-etere fosse in grado di liberare effettivamente tutto l'antigene presente nei sieri infetti, abbiamo sottoposto ad una ulteriore estrazione con solventi organici diversi anche il precipitato *a*); si è potuto constatare che il sistema CS_2 + acetone nel rapporto di 1 : 3 era ancora in grado di estrarre dei lipidi ad elevata reattività anti-

genica, indice questo che i metodi classici di estrazione totale possono fornire dati quantitativi abbastanza riproducibili, ma non sono in grado di isolare in maniera costante classi limitate di questi composti che presentano invece, dal punto di vista immunochimico, un particolare interesse.

Portato a secco; il residuo sottoposto a solubilizzaz. frazionata con: benzene, cicloesano, cloroformio, tetracloruro di carbonio, acetone e con miscele di cloroformio + acetone, acetone + cicloesano, acetone + benzene.

↓

Residuo disciolto con alcool metilico.

Da quanto siamo andati esponendo in questo primo capitolo si rileva che l'individuazione con metodi chimico-fisici di un complesso Ag-Ab nei sieri di soggetti con A. I. ha condotto all'individuazione e all'isolamento di proteine a carattere anticorpale e di lipoproteine a carattere antigenico, utili nella sierodiagnosi di questa malattia.

L'interesse presentato dal corredo lipidico dei sieri infetti, ed in particolare da quella parte alla quale è legata l'attività antigenica, ci ha spinto a ricercare nuovi e più moderni metodi di studio poichè riteniamo che l'importanza immunochimica di questi composti non sia limitata al campo dell'A. I., ma si possa ritenere di carattere più generale.

Capitolo II.

Ricerche sui lipidi dei sieri e degli eritrociti nell'A. I. degli equini.

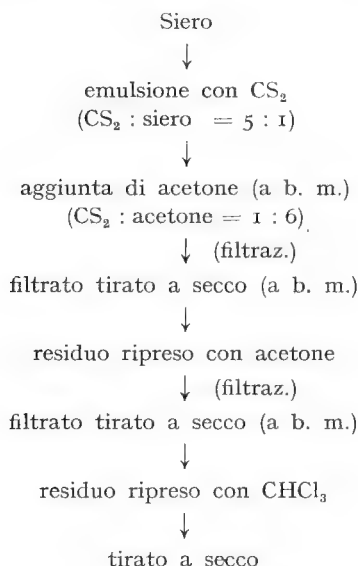
Nel precedente capitolo è stato messo in evidenza come l'estrazione con alcool-etere non conduca ad una liberazione totale dei lipidi serici e, verosimilmente, neppure di quelli tissurali; avendo potuto inoltre accertare l'ottima capacità estrattiva del sistema CS_2 + acetone sul residuo dell'estrazione normale, abbiamo ritenuto opportuno elaborare un metodo

per effettuare direttamente sui sieri e sui tessuti un'estrazione con questo sistema di solventi.

Gli estratti così ottenuti hanno effettivamente mostrato di possedere un forte e costante contenuto antigenico e la loro preparazione risulta inoltre relativamente rapida e di facile esecuzione.

Riportiamo in Tab. XI lo schema seguito: il siero in esame viene emulsionato con CS_2 nel rapporto di 1 : 5 e, dopo aggiunta di acetone a b. m. (CS_2 : acetone = 1 : 6) si lascia in riposo per 24 h a temperatura ambiente.

TABELLA XI.

Schema di estrazione con CS_2 e acetone.

Segue una filtrazione, ed il filtrato, tirato a secco a b. m., viene ripreso successivamente una prima volta con acetone, poi con $CHCl_3$ ed infine tirato nuovamente a secco.

Uno schema sostanzialmente analogo è stato adottato anche per l'estrazione di lipidi da eritrociti di soggetti sani e di soggetti colpiti da A. I.

Sugli estratti lipidici così ottenuti, nei quali — come si è detto — era stata riscontrata una forte reattività antigenica, abbiamo voluto applicare nuovi metodi di controllo chimico-fisico che ci consentissero di raggiungere maggiori informazioni sulle differenze esistenti tra gli estratti lipidici dei soggetti colpiti dalla virosi e quelli clinicamente sani.

Nelle condizioni sperimentali di estrazione non sempre si determina una denaturazione completa con conseguente insolubilizzazione delle proteine seriche, per cui gli spettri relativi possono presentare ancora gli assorbimenti delle lipoproteine. In tali casi una ulteriore estrazione con cloroformio porta ad una completa eliminazione dei protidi.

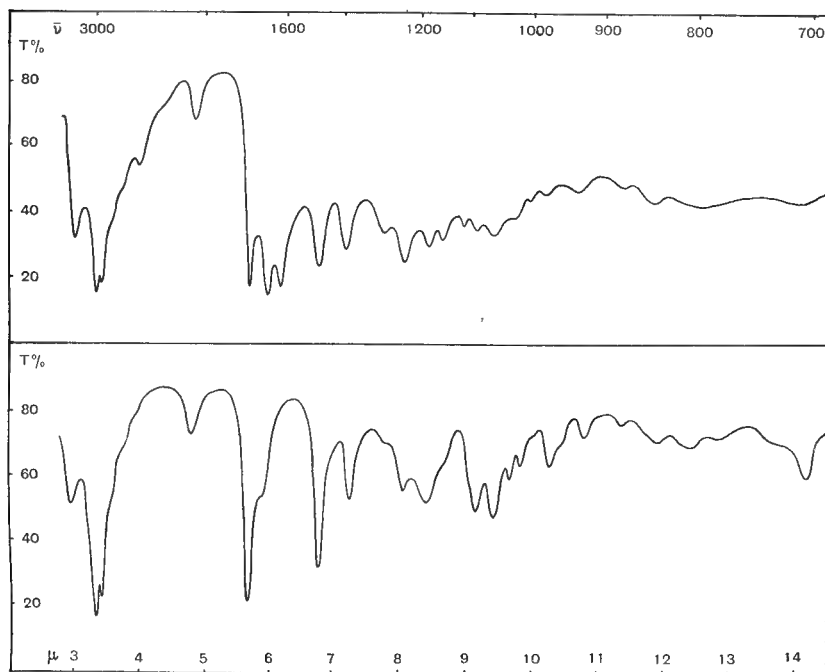



Fig. 7.
Curve di trasmissione di lipidi serici di cavallo normale (in alto) e dei medesimi ripresi con cloroformio (in basso).

Poichè l'estratto totale contiene accanto alle lipoproteine anche i lipidi, il suo spettro infrarosso presenta per lunghezze d'onda maggiori di 8 μ una serie di assorbimenti molto vicini provenienti dalle diverse specie molecolari, non sempre facilmente differenziabili l'uno dall'altro, e dopo 11 μ un assorbimento praticamente continuo.

Ci limitiamo quindi a descrivere unicamente lo spettro dei lipidi totali solubili in cloroformio (v. Tab. XI). Gli assorbimenti osservati sono elencati nella seguente tabella accanto alle loro assegnazioni. (Tabella XIII).

Gli spettri di tutti gli estratti ottenuti col metodo solfuro di carbonio-acetone sono analoghi a quello descritto, differendo quasi esclusivamente per il diverso contenuto in colesterolo. A questo riguardo occorre osservare che la presenza di quest'ultimo può essere rivelata in modo più sicuro,

TABELLA XIII.

	Intensità	Assegnazione
2.95	m	OH o NH
3,45	F	CH
3,52	m	CH
3,6	d	—
3,8	d	—
4,84	m	—
5,78	F	C=O
6,85	f	CH_2
7,25	m	CH_3
(*) 8,07	m	fosfolipidi (P=O) ?
(*) 8,6 (larga	m	esteri colesterilici, lecitine (C—O—C esteri)
(*) 9,2 } (*) 9,4 }	m	fosfolipidi (P—O—C) ?
9,5	d	colesterolo
9,7	d	—
9,85	d	—
(*) 10,3	m	lecitina
10,4	d	colesterolo
10,8	m	colesterolo + x
11,35	d	» »
11,9	d	colesterolo
12,5	d	»
(*) 13,78	m	grassi, esteri colesterilici, fosfolipidi CH_2 (catena)

anzichè utilizzando l'assorbimento a 9,5 μ che è quasi sempre mascherato dai fosfolipidi, mediante gli assorbimenti di intensità comparabile a 10,4; 11,9; 12,5; 13,45 μ, i quali hanno il vantaggio di cadere in regioni dello spettro lipidico normalmente sgombre da altri assorbimenti intensi.

Lo spettro è quindi nelle sue linee essenziali simile a quello che risulterebbe dalla somma dei due estratti acetonico e cloroformio-alcool (1 : 1) di Freeman e Coll.

Ma la caratteristica più importante che è sfuggita ai precedenti Autori è la presenza della banda di media intensità a 4,84 μ, la quale si trova pure con la medesima intensità nello spettro dell'estratto contenente ancora lipoproteine. Negli spettri riportati da Freeman e Coll. si nota un debole e largo assorbimento in questa regione spettrale solo in alcuni casi e precisamente nelle β_1 lipoproteine, nelle lipoproteine S_f 40-100, nelle lipoproteine dell'uovo, mentre per le T e L lipoproteine, per i chilomicrons,

(*) Le assegnazioni contraddistinte con asterisco sono fatte in base ai dati di Freeman e Coll. riportati precedentemente.

per i grassi, per le lecitine, per gli esteri colesterilici, per le sfingomieline esso è del tutto assente.

Negli estratti acetonici e cloroformio-alcoolici degli Autori citati non è stato possibile osservare tale assorbimento, anche se presente, poichè di quelle frazioni furono registrati gli spettri in soluzione nel solfuro di carbonio, solvente che assorbe intensamente proprio in quella regione. Occorre però rilevare che l'intensità di tale assorbimento è notevolmente più forte nei nostri spettri e che quindi la sua comparsa nella misura da noi riscontrata è con ogni verosimiglianza da mettere in relazione con il particolare metodo di estrazione seguito.

Questo assorbimento cade nella regione spettrale dei tripli legami, oppure dei doppi legami cumulati, ammesso che si tratti di una fondamentale di un composto presente nei lipidi normali.

Sulla discussione del significato e della assegnazione di tale banda ritorneremo più ampiamente in seguito.

Spettri I. R. degli estratti lipidici totali dal siero di cavalli con A. I.

Nella figura 8 è riportata la curva di trasmissione dei lipidi totali estratti col metodo descritto.

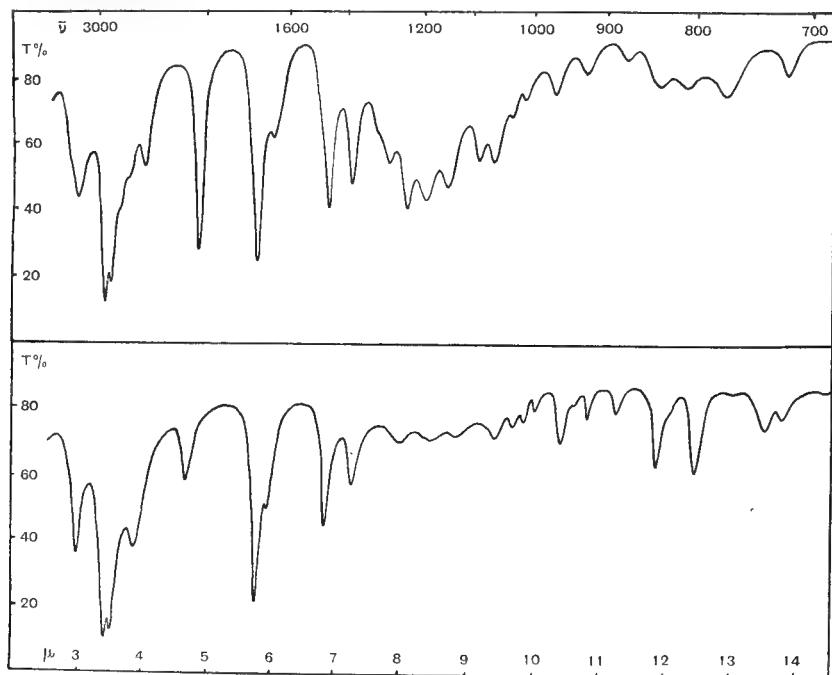



Fig. 8.

Curve di trasmissione dei lipidi del siero (in alto) e degli eritrociti (in basso) di cavallo colpito da A. I.

Gli assorbimenti sono elencati nella tabella seguente:

TABELLA XIV.

	Intensità	Assegnazione
2,96	m	OH
3,45	F	CH
3,52	m	CH
3,6	d	—
3,8	d	—
4,02	d	—
4,84	F	—
5,76	F	C=O
6,2	d	—
6,85	f	CH_2
7,25	m	CH_3
7,76	d	—
8,07	m	fosfolipidi
8,6 (larga)	d	esteri colesterilici, grassi
8,7	d	—
9,2 } 9,4 }	m	fosfolipidi
9,5	d	colesterolo
9,7	d	»
9,85	d	»
10,3	m	lecitine
10,4	d	colesterolo
10,8	d	»
11,4	d	»
11,9	m	»
12,4	m	»
12,95	m	—
13,4	d	colesterolo
13,78	m	grassi, esteri colesterilici, fosfolipidi

Anche in questi lipidi il contenuto in colesterolo è molto variabile da caso a caso; e qui risulta chiaramente evidente il vantaggio della scelta delle bande del colesterolo da noi proposte per la sua identificazione poichè negli spettri di questi estratti la banda a 9,5 μ è sempre completamente mascherata dall'assorbimento a 9,2 μ e 9,4 μ dei fosfolipidi.

Mentre la composizione in grassi, esteri colesterilici, fosfolipidi non sembra molto diversa da quella dei lipidi provenienti da soggetti sani, risultano subito evidenti due caratteristiche fondamentali dello spettro:

1) il fortissimo aumento di intensità (circa il doppio) della banda a 4,84 μ, che diventa una delle più intense dello spettro (la sua intensità è comparabile con quella della banda carbonilica);

2) la comparsa di una nuova banda di media intensità a 12,9 μ.

È logico pensare che la banda a 4,84 μ sia dovuta allora ad un nuovo composto contenuto nei lipidi totali estratti e che questo composto sia lo stesso (o per lo meno di costituzione chimica assai simile) che assorbe nella stessa posizione negli spettri di lipidi provenienti da cavalli sani.

Anche l'ipotesi che si tratti di un'armonica viene allora a cadere, mentre la presenza del nuovo assorbimento a 12,9 μ può avvalorare quella che si tratti di un nuovo composto finora non descritto negli estratti lipidici.

Infatti negli estratti lipidici totali l'assorbimento a 12,9 μ (di intensità media) si riscontra tutte le volte in cui l'assorbimento a 4,84 μ diventa molto forte; in qualche caso è stato possibile osservare un debole flesso in tale posizione anche nello spettro di estratti lipidici di soggetti sani.

Spettri I. R. degli estratti lipidici totali degli eritrociti dei cavalli con A. I.

Lo spettro dei lipidi estratti dai globuli rossi dei cavalli colpiti da anemia infettiva presenta i seguenti assorbimenti:

TABELLA XV (fig. 8).

	Intensità	Assegnazione
2,98	m	OH
3,45	F	CH
3,52	f	CH
3,9	d	—
4,78	m	—
5,76	f	C=O
6,85	m	CH_2 CH_3
7,25	m	CH_3
8,07	d	fosfolipidi
8,5 (larga)	d	esteri colesterilici, grassi
8,85	d	—
9,45	d	fosfolipidi, colesterolo
9,75	d	colesterolo
9,9	d	»
10,05	d	»
10,45	m	»
10,8	d	»
11,3	d	»
11,9	m	»
12,5	m	»
13,55	m	»
13,78	m	grassi, esteri colesterilici, fosfolipidi

Lo spettro è di aspetto nettamente diverso da quello dei lipidi da sieri essenzialmente per la presenza di molto colesterolo e per la minor

quantità degli altri componenti (grassi, esteri colesterilici, lecitine, fosfolipidi).

L'assorbimento nella regione di 4,8 μ è ancora presente: la banda, di media intensità, si trova però qui spostata leggermente verso le frequenze maggiori a 4,78 μ.

Inoltre anche il suo aspetto è diverso, in particolare l'ampiezza della banda è molto maggiore che non per la banda 4,84 μ, presente negli spettri dei lipidi serici.

L'eventuale presenza di una banda a 12,9 μ analoga a quella che accompagna costantemente l'assorbimento a 4,84 μ non si è qui potuta riscontrare per la presenza dell'assorbimento a 12,5 μ di forte intensità caratteristico del colesterolo.

Sullo spostamento dell'assorbimento a 4,8 μ e sulla forma della banda ritorneremo in seguito.

Determinazioni spettrofotometriche quantitative.

Poichè dall'esame degli spettri degli estratti lipidici totali dai sieri si è riscontrata la presenza dell'assorbimento a 4,84 μ, la cui intensità è maggiore nel caso di soggetti infetti, abbiamo ritenuto opportuno eseguire delle misure quantitative su tale banda, allo scopo di vedere se fosse possibile differenziare i lipidi di provenienza diversa ed in particolare quelli di soggetti normali da quelli con A. I.

L'intensità della banda può essere studiata molto bene in soluzione cloroformica, poichè il cloroformio è completamente trasparente in questa regione. Le determinazioni sono state eseguite tutte in cella di 0,4 mm. di spessore ed i risultati ottenuti sono elencati nella seguente tabella:

TABELLA XVI.

Cavallo normale	K	Cavallo con A. I.	K
Margaret 1391	4,5	Lampo 1061	11
Cavallo n. 32	2,3	» 18	11
		» . . . . . —	12
		Sandro . . . . . 17 (infettato artificialmente)	12,5

La costante K è calcolata dalla legge di Beer $D = KC$ dove

D è la densità ottica misurata in corrispondenza del massimo d'assorbimento;

K è il prodotto del coefficiente di estinzione per lo spessore in mm.;

C è la concentrazione espressa in grammi/100 cc. di cloroformio.

Dall'esame dei casi finora studiati risulta che nei soggetti ammalati l'intensità è circa doppia rispetto a quella dei soggetti sani; inoltre la costanza dei valori di K per lo stesso soggetto (Lampo) in epoche successive, oppure su soggetti diversi nelle stesse condizioni cliniche è una conferma che il metodo di estrazione proposto è ben riproducibile.

In qualche caso si può notare che la banda, nella soluzione cloroformica, presenta accanto all'assorbimento principale a 4,84 μ un altro assorbimento più debole a 4,78 μ.

Come è già stato detto quest'ultimo è stato normalmente riscontrato negli estratti degli eritrociti, per cui potrebbe quindi anche darsi che il componente responsabile di quest'ultimo assorbimento si trovi in piccole quantità nei lipidi estratti dai sieri.

Una migliore valutazione dell'intensità dell'assorbimento a 4,8 μ potrà ottenersi dalla misura dell'area della banda tenendo perciò conto anche dell'assorbimento laterale dopo aver naturalmente condotto analoga determinazione sui lipidi estratti dagli eritrociti.

L'esame degli spettri infrarossi di questi estratti lipidici totali ha quindi permesso di confermare i risultati sierologici sulla riproducibilità del metodo al CS_2-acetone, mettendone inoltre in evidenza la migliore capacità estrattiva rispetto agli altri sistemi proposti, o per lo meno la maggiore selettività nei confronti di nuovi componenti che sono stati individuati spettroscopicamente per mezzo dell'assorbimento a 4,8 μ.

La caratteristica più interessante di questi nuovi componenti è il loro notevole aumento di concentrazione negli estratti lipidici da sieri di soggetti con A. I. nei confronti dei corrispondenti estratti provenienti da soggetti normali.

Inoltre è stato possibile rilevare che per il rimanente la composizione qualitativa degli estratti lipidici totali è in ogni caso la stessa, notandosi unicamente variazioni, talvolta anche sensibili, nelle quantità relative delle varie classi di componenti.

Capitolo III.

Ricerche sui lipidi dei sieri e degli eritrociti umani normali e tumorali.

Come avevamo accennato in una nota precedente all'Accademia delle Scienze di Torino nel gennaio dello scorso anno (1), e come avevamo poi riferito con maggiori dettagli in una comunicazione fatta più di recente all'Accademia di Medicina di Torino (46), le proprietà immunochimiche dei lipidi e delle lipoproteine riscontrati ed isolati dai sieri ci avevano consentito di mettere in evidenza un potere antigenico verso i sieri di portatori di tumore, che si va dimostrando utile nella sierodiagnosi delle neo-

plasie quando si utilizzi la tecnica della reazione di deviazione del complemento modificata (DDCM).

Le ricerche sull'attività immunochimica di queste particolari classi di composti si riallacciano a tutta una serie di studi analoghi sulle proprietà immunochimiche di agenti cancerigeni endogeni ed esogeni, che in alcuni casi hanno consentito l'applicazione della reazione di DDC normale nella sierodiagnosi delle neoplasie con risultati che sono stati considerati senz'altro promettenti, anche se non hanno finora consentito di definire la natura chimica e l'importanza delle entità reattive, presenti nei sieri dei portatori di tumore e che si possono considerare caratteristiche di questa particolare forma morbosa.

Ci è impossibile riportare qui una rassegna completa degli studi compiuti in questo campo, e ci limitiamo perciò a segnalare alcuni lavori che riteniamo particolarmente interessanti.

Le prime esperienze significative sono rappresentate dai lavori di Hirszfeld e Halber (47), i quali saggiarono le proprietà antigeniche di estratti alcoolici sensibilizzati con colesterolo nella reazione di deviazione del complemento; questo saggio sierologico, che aveva fornito alcuni risultati positivi, fu ulteriormente sperimentato da Eiseler e Jacobsohn (1931), da Sievers nel 1932, da Lehmann-Facius pure nel 1932 e da Zacho nel 1936, i quali giunsero però alla conclusione che si trattava di un fenomeno di reattività aspecifica.

Nel campo dei tumori sperimentali sono da ricordare le esperienze di Hoyle (48), che ottenne per il sarcoma M37 del ratto (ed unicamente per questo) delle sierodiagnosi positive con un antigene costituito dall'estratto salino del sarcoma, o, meglio ancora, da un estratto alcoolico del medesimo. I risultati positivi, secondo Hoyle, sarebbero condizionati dalla presenza di anticorpi specifici capaci di determinare la fissazione del complemento.

In una serie di lavori Penn (49, 50) ha riferito come sottoponendo ad un complesso frazionamento estratti lipidici ottenuti dal fegato di portatori di tumore, ha potuto constatare che il residuo insaponificabile possiede potere antigene e che gli spettri di fluorescenza presentano delle analogie con quelli del metilcolantrene. Questa stessa frazione insaponificabile era inoltre in grado di dare reazioni di flocculazione con sieri di portatori di tumore maligno, mentre la stessa reazione risultava negativa, salvo rare eccezioni, contro sieri di soggetti clinicamente sani.

Queste osservazioni sono state integrate dai lavori di Hauschka (51) sull'accertamento della possibile interferenza di antigeni tissurali organo-specifici (catepsine, lipidi, sostanze del gruppo sanguigno, fattori di isto-compatibilità, antigeni di Wassermann e Forssman), e che non hanno nessuna relazione col processo canceroso. L'A. ha inoltre sollevato l'inte-

resse attorno alla tromboplastina (o cefalina) che, nell'ambito della reazione sierologica di controllo, può dare origine ad una serie di reazioni aspecifiche tali da infirmare il significato immunochimico del saggio stesso.

Malgrado il verificarsi di tali interferenze, lo stesso Hauschka, ha confermato l'opportunità di proseguire queste ricerche mettendole in relazione con fenomeni più generali connessi con la specificità del tessuto.

Le ricerche di Penn sulla interpretazione della reazione di flocculazione data dall'insaponificabile del tessuto epatico canceroso contro sieri di portatori di tumore sono state riprese dallo stesso Autore in collaborazione con altri ricercatori (52, 53) e da Chang e Coll. (54, 55, 56, 57), i quali ultimi hanno studiato la composizione chimica dell'« antigene » usato da Penn, isolando e sintetizzando una numerosa serie di composti per lo più steroidi derivati dell'acido colanico, proponendo infine un nuovo tipo di reazione di sieroflocculazione che permette di valutare direttamente l'attività sieroflocculante di ciascuno di questi composti.

L'attenzione si è inoltre fissata sulla dimostrazione di anticorpi più o meno specifici evocati da tumori trapiantabili e sull'attività antigenica di coniugati proteine-carcinogeni; fatti questi che sono stati interpretati come la dimostrazione dell'esistenza di termini di passaggio tra carcinogeni esogeni ed endogeni.

Nei lavori di Rondoni (58) viene soprattutto sottolineata l'importanza che rivestono le lipoproteine seriche; concetto questo che era già stato esposto da Hauschka, il quale affermava come lipidi e lipoproteine possano essere interessati in modo basilare nella individualità antigenica dei neoplasmi.

I progressi che in questi ultimi anni si sono verificati nel campo della immunologia generale hanno riproposto con nuove prospettive il problema della esistenza di fenomeni immunochimici connessi con l'insorgenza e lo sviluppo dei tumori, problema che è stato oggetto di studi particolarmente approfonditi in molti Centri e soprattutto in grandi Istituti specializzati nelle ricerche sul cancro: lo Sloan Kettering Institute for Cancer Research, il Rockfeller Institute for Medical Research e il National Cancer Institute negli Stati Uniti; l'Istituto di Patologia Sperimentale e di Terapia del Cancro a Mosca, l'Istituto di Oncologia di Leningrado, e l'Istituto Ucraino di Epidemiologia e Microbiologia di Kiev nell'Unione Sovietica; l'University College e l'Institute for Cancer Research di Londra e l'Istituto Pasteur di Parigi.

Abbiamo segnalato questi Centri particolari perchè da essi è stato preso in considerazione, e con i metodi più moderni, il problema estremamente complesso della ricerca immunochimica con l'intento di trasferire le nuove acquisizioni nel campo ben più vasto della terapia dei tumori.

Con esperienze appropriate, soprattutto in campo biologico, si è voluto tener conto della impossibilità (in taluni casi ben documentata) di separare con i mezzi chimici normalmente a disposizione, singole classi di composti a reattività sierologica, ed antigenica in particolare, che costituiscono estratti totali proteici e lipoproteici provenienti da siero o da tessuto normale e tumorale.

I molteplici lavori svolti presso lo Sloan Kettering Institute for Cancer Research e compendiati nel rapporto scientifico pubblicato nel giugno 1956 (59), hanno permesso non solo di stabilire alcune relazioni fra l'insorgenza dei tumori e le resistenze naturali, ma hanno consentito altresì di formulare l'ipotesi, già convalidata da alcuni risultati sperimentali, che sia possibile suscitare l'immunità nei riguardi dei tumori (60, 61), per quanto si tratti di un meccanismo diverso dai soliti. È stato, ad esempio, possibile stabilire che un composto chimico di natura « grassa », presente nei tessuti neoplastici dell'uomo, è capace di indurre una reazione immunitaria se iniettato in animali di altra specie. Questo componente sembra essere presente quasi esclusivamente nel tessuto canceroso e senz'altro in questo tessuto si trova in quantità molto più sensibile che in qualsiasi altro.

Inoltre un adattamento della tecnica microscopica sembra aver consentito l'individuazione di anticorpi tumorali, mentre il controllo degli ormoni steroidici della ghiandola surrenale sembra lasci prevedere che una opportuna somministrazione di composti chemioterapici, possa rinforzare il processo di immunizzazione naturale.

Fondamentalmente queste osservazioni starebbero ad indicare, se confermate, la reale esistenza di un fenomeno di immunità contro il cancro.

Zilber dell'Istituto Centrale di Epidemiologia e Microbiologia di Mosca, ha potuto documentare mediante la reazione anafilattica nelle cavie l'esistenza di antigeni specifici nel tessuto tumorale (62): animali da esperimento, sensibilizzati con tessuto neoplastico e successivamente desensibilizzati con frazioni di tessuto omologo normale, subivano ancora uno shock anafilattico di varia intensità se ad essi venivano nuovamente somministrati omogenati di tessuto neoplastico. Importantissimo è il fatto che si perviene ad un identico risultato sia nei tumori umani, come pure nei tumori sperimentali (in particolare il papilloma di Shope del coniglio).

Attraverso prove di adsorbimento degli stessi tessuti su eritrociti l'A. avrebbe raggiunto inoltre la prova dell'esistenza di un componente proteico specifico delle cellule tumorali localizzato nella frazione mitocondriale e nei microsomi.

L'Accademia delle Scienze di New York ha preso in considerazione questi stessi argomenti in una Conferenza su « Immunologia e Tumori »

tenutasi a New York nei primi giorni del gennaio di quest'anno (63). Nel corso di tale conferenza, alla quale partecipò uno di noi (C. A.) (*), ebbe luogo una discussione di carattere generale sui « Metodi fisici per l'analisi delle cellule » di Beard, sui « Metodi chimici per l'analisi delle cellule » di Potter, sui « Metodi citochimici per l'analisi delle cellule » di Pollister, una rassegna di Snell sui fenomeni di istocompatibilità, ed una importante relazione di Hauschka e Amos sugli « Aspetti citogenetici della istocompatibilità »; venne pure presentata da Grabar e Plescia una rassegna ed una messa a punto sulle possibilità dei metodi sierologici e delle analisi immunochimiche, e sui risultati sierologici applicando l'analisi immunochimica alla reazione di fissazione del complemento (Rapport); dove venivano ripresi e convalidati i risultati di lavori precedenti sulla asserita specificità del saggio sierologico per la individuazione dei tumori. Segnaliamo inoltre una relazione di Witebsky sulla specificità degli antigeni tissurali, argomento che lo stesso A. aveva ampiamente trattato in un lavoro precedente (64); ed infine un lavoro di Korngold « Sulla distribuzione e proprietà immunochimiche del tessuto umano e sugli antigeni tumorali ».

Prima di chiudere questa rassegna segnaliamo ancora la possibile interferenza, nei fenomeni immunitari riguardanti i tumori, della properdina, descritta da Pillemer (65, 66), e che nei sieri di portatori di tumore risulta notevolmente diminuita rispetto ai sieri normali.

Inoltre, nei recenti lavori di Herbut e Kraemer (67) sul carcinoma umano trapiantabile del colon H132, verso il trapianto del quale la resistenza animale è eccezionalmente buona, si osserva come una somministrazione di zymosan, capace di legarsi alla properdina, distrugga o comunque diminuisca notevolmente tale resistenza producendo sullo stesso animale un effetto analogo a quello prodotto da una irradiazione totale.

Estrazione di lipidi da sieri e da eritrociti umani normali e tumorali.

Avevamo già segnalato (46) la presenza di un'attività immunochimica, ed in particolare antigenica, nei lipidi delle lipoproteine tumorali ottenuti per estrazione diretta dei sieri e dei tessuti con diversi solventi (tra i quali il glicole etilenico). Un comportamento particolarmente soddisfacente si è riscontrato negli estratti ottenuti col metodo al CS_2

(*) Ringraziamo vivamente l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte e della Liguria per la concessione di una Borsa di studio, che ha consentito al dr. C. Ambrosino di partecipare ai lavori della conferenza.

ed acetone, già utilizzato per l'estrazione dei lipidi serici di equini colpiti da A. I.

Parallelamente all'estrazione dei lipidi serici, abbiamo effettuato estrazioni analoghe, e con gli stessi metodi, dei lipidi veicolati dagli eritrociti di portatori di tumore dato l'alto contenuto lipidico della parete stromatica e per l'importanza che normalmente viene attribuita ai globuli

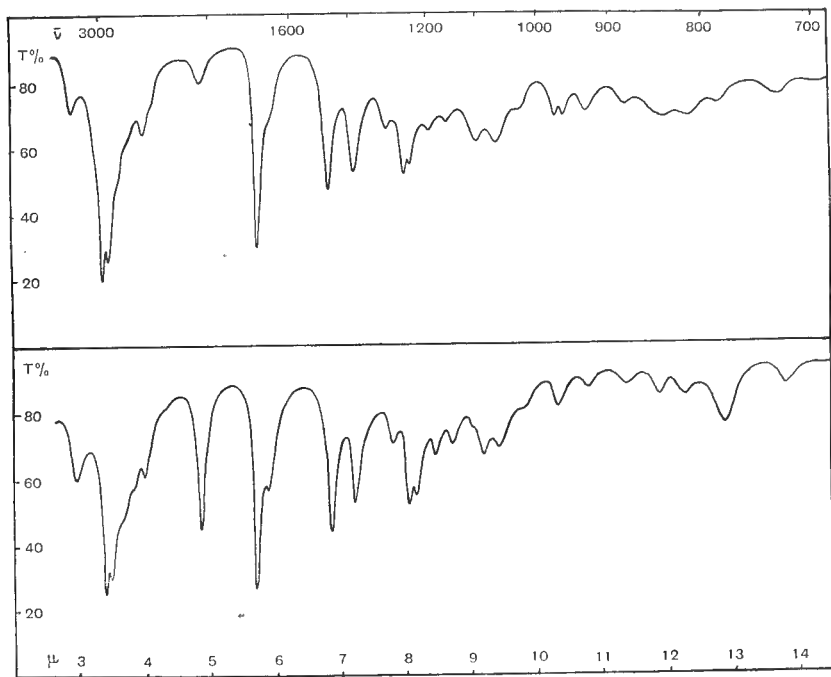



Fig. 9.
Curve di trasmissione dei lipidi serici umani normali (in alto) e tumorali (in basso).

rossi nei fenomeni di adsorbimento e di trasporto dei complessi antigene-anticorpo.

Anche di questi estratti lipidici sono stati studiati gli spettri di assorbimento nell'I. R., che vengono qui brevemente discussi confrontandoli con quelli dei corrispondenti estratti normali (fig. 9).

Nella seguente tabella sono riportati gli assorbimenti di un estratto lipidico totale ottenuto da siero di uomo normale (Tab. XVII).

Lo spettro è nelle sue linee generali simile a quello osservato per i lipidi estratti dal siero di cavallo normale (vedi Cap. II).

Anche la banda a 4,84 μ è presente; la sua intensità è però circa la metà di quella riscontrata nei lipidi serici di equini normali. Segnaliamo inoltre la banda a 12,95 μ che, come abbiamo già rilevato, accompagna

TABELLA XVII.

	Intensità	Assegnazione
2,95	m	OH
3,45	F	CH
3,52	m	CH
3,6	d	—
3,95	d	—
4,84	m	—
5,76	F	C=O
6,85	m	CH_2 CH_3
7,25	m	CH_3
7,76	d	—
8,07	m	fosfolipidi
8,55 larga	d	grassi, esteri colesterilici
9,2 } 9,4 }	m	fosfolipidi
9,8	d	—
10,3	d	lecitine
10,45	m	colesterolo
10,8	d	»
11,45	d	»
12	d	»
12,5	d	»
12,95	d	—
13,78	m	grassi, esteri colesterilici, fosfolipidi

costantemente quella a 4,84 μ. Nonostante la intensità relativamente piccola di quest'ultima è possibile la sua individuazione, perchè in generale in questi estratti lipidici è contenuto in minima quantità il colesterolo, che assorbe, come già è stato detto, fortemente a 12,5 μ e a 13,5 μ.

Il fatto cui già si è accennato che le bande a 12,95 μ e 4,84 μ appartengono allo stesso composto è ulteriormente avvalorato dall'esame degli spettri di lipidi estratti da sieri umani di portatori di tumori, i cui assorbimenti sono riportati nella Tab. XVIII.

L'intensità della banda a 4,84 μ è circa doppia di quella che si riscontra nei lipidi estratti da siero di uomo normale e quindi all'incirca della stessa intensità di quella osservata nei lipidi serici di equino normale. La banda a 12,95 μ è qui nettamente visibile e diventa di media intensità. Il parallelismo con gli spettri dei lipidi provenienti dai sieri di equini è notevole, tanto più quando si confrontino fra di loro gli spettri dei lipidi estratti dagli eritrociti (fig. 10).

TABELLA XVIII.

	Intensità	Assegnazione
2,95	m	OH
3,45	F	CH
3,52	d	CH
3,6	d	—
3,95	d	—
4,84	m-f	—
5,76	f	C=O
6,85	m	CH_2 CH_3
7,25	m	CH_3
7,85	d	—
8,07	m	fosfolipidi
8,55 (larga)	d	grassi, esteri colesterilici
9,2 } 9,4 }	m	fosfolipidi
10,3	d	lecitine
10,8	d	colesterolo
11,4	d	»
11,9	d	»
12,4	d	»
12,95	m	—
13,8	d	grassi, esteri colesterilici, fosfolipidi

Poichè si è riscontrato in tutti i casi finora esaminati un aumento di intensità della banda a 4,84 μ negli estratti lipidici tumorali rispetto ai corrispondenti normali, abbiamo eseguito delle determinazioni spettrofotometriche quantitative nelle stesse condizioni già descritte nel Cap. II per gli estratti da sieri di equini.

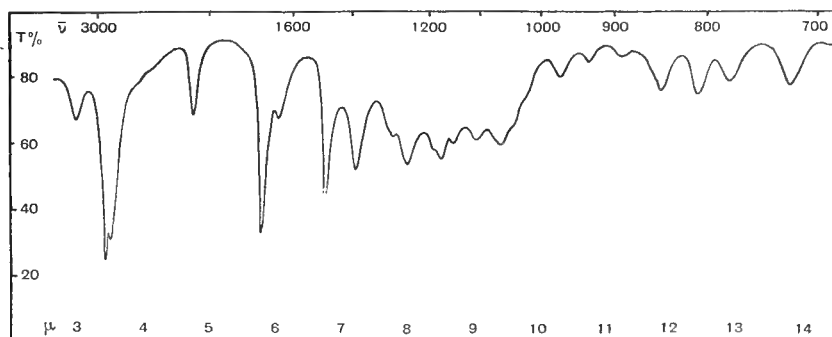



Fig. 10.
Curva di trasmissione dei lipidi di eritrociti di portatori di tumori.

I risultati più significativi ottenuti sono riportati nella seguente Tabella XIX.

TABELLA XIX.

Uomo normale	K	Uomo con tumore	K
siero n. 21	2,0		
siero n. 23	3,6		
siero n. 24	3,6	siero n. 181	5,5
siero n. 26	3,1		
siero n. 179	3,1		

L'esame spettrofotometrico nell'I. R. ha quindi permesso di stabilire che la composizione degli estratti lipidici ottenuti col metodo descritto è qualitativamente eguale sia per l'uomo normale che per i portatori di tumore. Le classi dei componenti chimici sono le stesse già osservate nei lipidi dei sieri equini: è infatti presente anche in questo caso l'assorbimento a 4,8 μ, che aumenta d'intensità nei portatori di tumori.

CAPITOLO IV.

Frazionamento dei lipidi estratti dai sieri e dagli eritrociti.

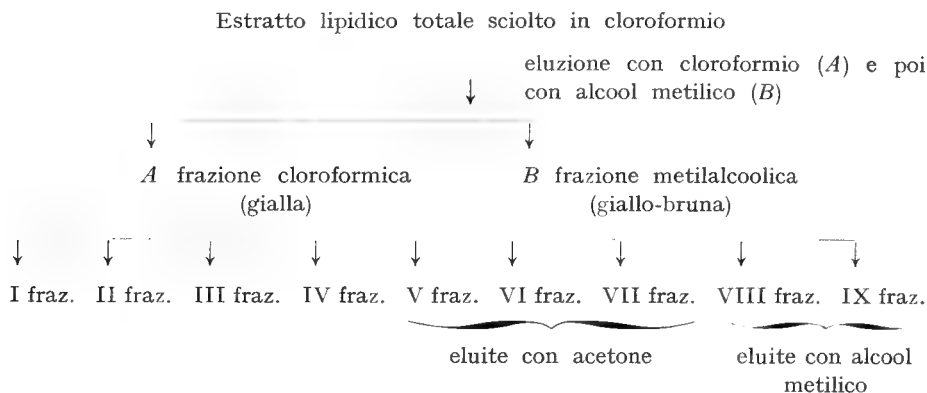
Constatata la notevole somiglianza negli spettri di tutti gli estratti lipidici totali esaminati (capitolo II), che starebbe ad indicare una somiglianza nella composizione chimica, abbiamo voluto vedere se ciò fosse dovuto unicamente alla predominanza di uno o pochi componenti o se fosse in realtà una caratteristica fondamentale di queste miscele.

Ci è parso utile a questo fine tentare un frazionamento cromatografico dei lipidi ritenendo tale metodo il più adatto ad effettuare, se non una separazione di tutti i componenti, almeno un arricchimento in qualcuno di essi, ed il più idoneo per trattare le piccole quantità di materiale a disposizione.

Del resto, come è noto, il metodo cromatografico è già stato ampiamente impiegato con successo per lo studio di miscele di complessità e composizione chimica analoghe a quelle dei nostri estratti lipidici.

La cromatografia è stata eseguita su colonne di silice setacciata attraverso setacci da 2500 maglie per cm^2.

I lipidi sciolti in cloroformio vennero eluiti successivamente con cloroformio ed alcool metilico. Si ottennero così due frazioni: una cloroformica colorata intensamente in giallo, una metilalcoolica colorata in giallo-bruno.

Queste due frazioni vennero poi nuovamente sottoposte a cromatografia sempre su colonna di silice secondo il seguente schema:

Descriviamo ora rapidamente l'aspetto e le caratteristiche di ciascuna di queste nove frazioni.

I) È colorata intensamente in giallo. Dopo evaporazione del cloroformio lascia un residuo di aspetto grasso.

II) È colorata in giallo. Dopo evaporazione del cloroformio lascia un residuo oleoso contenente dei cristalli chiari.

III) Simile alla precedente, ma con maggiore quantità di cristalli bianchi che hanno l'aspetto di colesterolo.

IV) È simile alla prima frazione ma meno colorata.

V) Colorata in bruno. Dopo evaporazione dell'acetone lascia un residuo bruno molto vischioso.

VI) Colorata fortemente in rosso. Per evaporazione dell'acetone lascia un residuo rosso-bruno semisolido.

VII) Colorata in bruno, simile alla V.

VIII) Colorata intensamente in giallo-arancio.

IX) Simile all'VIII frazione.

Questa descrizione è di carattere generale: le frazioni elencate sono state ottenute partendo da circa 50 mgr di estratto lipidico su colonna di un cm. di diametro e di 30 cm. di lunghezza riempite di silice per 2/3. Le prime 4 frazioni sono normalmente costituite da 20 cc. di eluato ciascuna, la quinta è una frazione di « transizione » il cui volume è variabile da caso a caso, la sesta è ottenuta per completa eluzione della sostanza rossa e le ultime tre sono nuovamente costituite da circa 20 cc. di eluato ciascuna. Naturalmente si possono avere delle notevoli variazioni per quello che

riguarda le quantità relative delle varie frazioni di cui qualcuna è talvolta assente.

Da notare ancora che spesso resta sulla colonna, da cui si sono ottenute le frazioni *A*) e *B*), dopo completa eluzione con alcool metilico, una parte fortemente adsorbita colorata in bruno, che non siamo riusciti ad allontanare con nessun solvente.

Ogni deviazione dall'andamento generale descritto verrà indicata di volta in volta.

Allo scopo di seguire il frazionamento e di studiare la composizione delle singole frazioni ottenute, ne abbiamo registrato gli spettri I. R.

Nelle tabelle che seguono sono elencate le bande di assorbimento per ciascuna frazione esaminata nei singoli casi.

Gli spettri sono riportati nelle figure 11, 12, 13.

TABELLA XX.

Assorbimenti delle frazioni lipidiche dal siero di equini normali e con A. I.

Frazione *A*		Assegnazione	Frazione *B*	
normale	A. I.		normale	A. I.
2,98 m	2,98 m	OH	2,98 m	2,98 m
3,45 F	3,45 F	CH	3,45 F	3,45 F
3,52 d	3,52 d	CH	3,52 m	3,52 m
3,6 d	3,6 d	—	4,84 mf	4,84 f
5,76 F	5,76 F	CO	5,76 F	5,76 F
6,85 f	6,85 f	CH_2, CH_3	6,75 mf	6,75 f
			6,85 d	
7,25 m	7,25 m	CH_3	7,25 d	7,25 d
8,07 d	8,07 d	fosfolipidi	8,07 d	8,08 d
8,5 fm	8,5 fm	grassi, esteri colesterilici	8,4 d	
9,2 d	9,2 d }	fosfolipidi	9,1 m (larga)	8,9 m }
9,4 d	9,4 d }			9,2 m } larga
9,7 d	—	colesterolo	9,5 m (larga)	9,6 m }
9,85 d	9,9 d	»		
10,2 d	—	»	10,2 d	10,2 flesso
10,4 m	10,4 m	»	10,4 d	
11,4 d	11,4 d	»		
11,9 m	11,9 m	»		
12,1 d	12,1 d	—	12 d	12 flesso
12,5 m	12,5 m	colesterolo	12,8 m (larga)	12,82 m
13,5 d	—	»		
13,78 mf	13,78 m	grassi, esteri colesterilici, fosfolipidi		

Lipidi estratti dai sieri di cavalli normali e con A. I.

Gli spettri delle frazioni *A* ottenute dai lipidi serici di cavalli normali e con A. I. sono molto simili fra di loro e così pure quelli delle frazioni *B*. Ciò indica sostanzialmente la stessa composizione qualitativa nei due casi. Come è stato confermato dagli ulteriori frazionamenti, l'unica differenza importante è l'intensità maggiore della banda a 4,84 μ nei lipidi provenienti da cavallo malato. Come si nota nella tabella XX questa banda è presente unicamente nell'eluato alcolico (fraz. *B*).

La frazione *A*, che è la parte più abbondante dell'estratto lipidico totale (almeno il 70-80%) evidentemente non può presentare per il resto diversità notevoli dallo spettro di quell'estratto, cui conferisce l'aspetto e l'andamento generale.

Poichè il comportamento cromatografico e quello spettrofotometrico sono gli stessi, a parte le differenze già rilevate tra cavalli normali e con A. I., in quel che segue non sarà più fatta alcuna distinzione tra questi due casi.

Fraz. I + IV. — La prima è normalmente abbondante e la quarta trascurabile. La loro composizione è risultata la stessa. Lo spettro è quello tipico dei grassi (esteri di acidi grassi) con tracce di colesterolo (fig. 11).

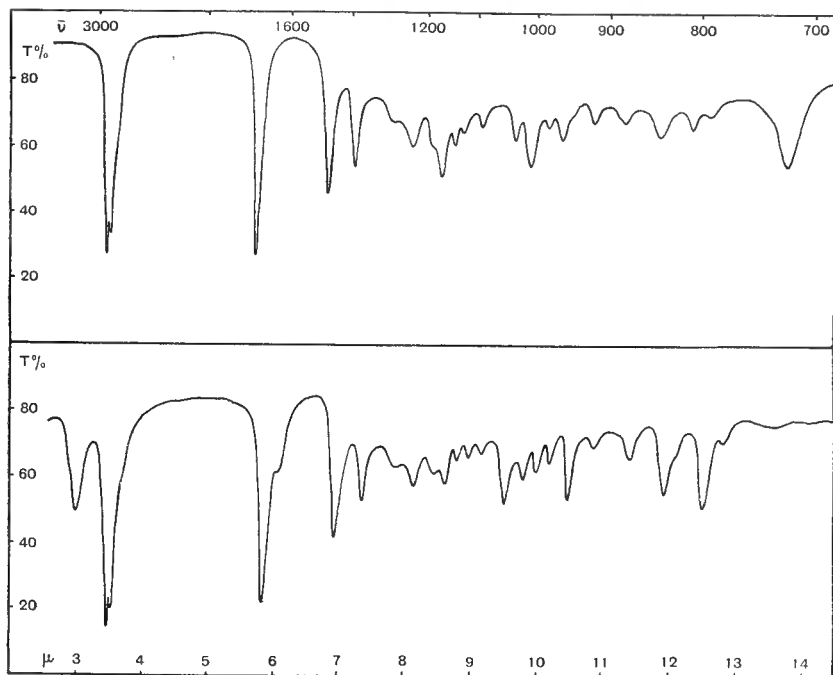



Fig. 11.
Curve di trasmissione delle frazioni cromatografiche I + IV (in alto) e II + III (in basso) dei lipidi serici di equino.

Ciò è rivelato dalla assenza dell'assorbimento ossidrilico (tranne il piccolo assorbimento dovuto al colesterolo), dagli assorbimenti nella regione dei 3,4 μ e 5,8 μ (bande molto strette ed intense) dagli assorbimenti a 6,85 (CH_2, CH_3), 7,25 (CH_3) e 13,78 (CH_2 — catene lunghe) ed infine dagli assorbimenti tipici tra 8 e 10 μ (Freeman e Coll.) (44). La presenza del colesterolo è rivelata dalla banda cui si è già accennato nel cap. II.

Fraz. II + III. — Simili tra di loro e costituite essenzialmente da grassi e da molto colesterolo. La II contiene più colesterolo della terza. Lo spettro risulta infatti dalla sovrapposizione di quello della frazione precedente e di quello del colesterolo (fig. 11).

L'andamento della composizione di queste frazioni indica che il colesterolo è « sciolto » o per lo meno veicolato dai grassi, che sono in quantità più abbondante. Ciò spiega perchè la IV frazione abbia nuovamente la composizione della prima, ed è confermato da quanto diremo in seguito a proposito dei lipidi provenienti da globuli.

Frazione V. — Sempre molto scarsa e talvolta assente. Non si è mai potuta analizzare spettrofotometricamente.

Frazione VI. — È la frazione rossa che risulta costituita dal componente responsabile dell'assorbimento a 4,84 μ che è qui il più intenso di

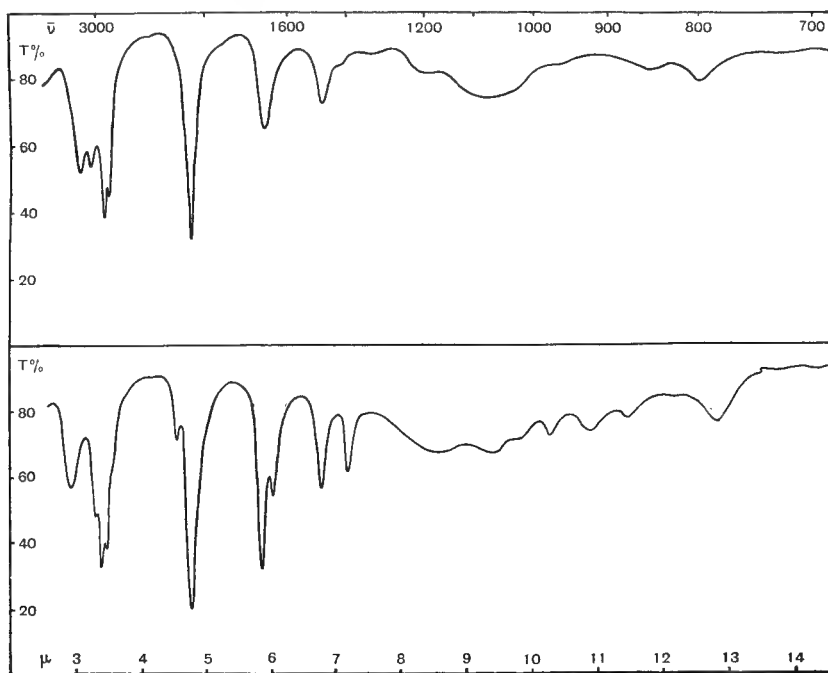



Fig. 12.
Curve di trasmissione delle frazioni cromatografiche VI (in alto) e VII + VIII in (basso) dei lipidi serici di equino.

tutto lo spettro. Questa sostanza, certamente non ancora pura è difficilmente isolabile da altri composti oleosi che l'accompagnano, i quali però in questa frazione sono in piccola quantità. Lo spettro è molto povero di assorbimenti. Esistono due bande nella regione dei 3 μ molto larghe e spostate verso le frequenze minori. Non esiste più la banda carbonilica, per lo meno nella sua posizione normale, e si hanno infine un assorbimento molto largo tra 9 e 10 μ e la banda di media-debole intensità a 12,8 μ (fig. 12).

Purtroppo abbiamo ottenuto pochissima sostanza in questo stato di purezza; per cui anche i valori degli assorbimenti possono essere soggetti ad errore, pur essendo concordanti con quelli ricavabili da frazioni meno pure ottenute in seguito.

Frazione VII. — È costituita dallo stesso componente o dagli stessi componenti della precedente, inquinata dal contenuto dell'VIII frazione.

Sono infatti nel suo spettro riscontrabili tutte le bande della frazione VI (fig. 12).

Sono però anche visibili le bande: $C = O$ a 5,76 μ; CH_2 a 6,85 μ; CH_3 a 7,25 μ, nonchè una banda molto larga a 8,5 μ.

In questa frazione sono contenute molto probabilmente delle lecitine.

La caratteristica più importante è però anche qui l'assorbimento a 4,84 μ, il più intenso di tutto lo spettro, che in questo caso si presenta doppio; è accompagnato infatti da un assorbimento debole ma nettamente risolto a 4,6 μ.

Anche questo fatto verrà discusso ulteriormente e ci limitiamo qui a segnalarlo.

Frazioni VIII e IX. — Sono normalmente assai scarse nei lipidi provenienti dai sieri di equini e non siamo riusciti a determinarne gli spettri.

Nella Tab. XXI sono riportati gli assorbimenti delle frazioni descritte.

Lipidi estratti dai sieri di uomo normale e di portatore di tumore.

Per quello che riguarda le frazioni *A* e *B* (tab. XXII) e le prime quattro frazioni cloroformiche l'andamento della separazione e degli spettri è lo stesso di quello descritto per gli estratti da sieri equini.

Per quanto riguarda invece le ultime frazioni occorre osservare quanto segue: la frazione V è in piccola quantità e non si è potuta analizzare; la frazione VI è anch'essa in piccola quantità e non si è potuta analizzare; il suo aspetto (colore rosso intenso), la sua posizione e la sua velocità di eluzione sono gli stessi riscontrati per la frazione VI degli estratti lipidici degli equini.

La frazione VII (acetonica) è simile alla VII descritta per il cavallo; sono però nettamente osservabili le lecitine; la banda a 4,84 μ è meno intensa e non presenta l'assorbimento laterale a 4,6 μ.

TABELLA XXI.

Assorbimento delle frazioni lipidiche dai sieri di cavalli normali e con A. I.

Fraz. I ÷ IV	Fraz. II + III	Fraz. V	Assegnazione	Fraz. VI	Fraz. VII	Fraz. VIII
	2,98 m	in piccola quantità, non è stato possibile registrare lo spettro	OH		2,98 m	in piccola quantità, non è stato possibile registrare lo spettro
				3,12 m		
				3,26 m		
					3,35 flesso	
3,45 F	3,45 F		CH	3,45 F	3,45 F	
3,52 m	3,52 m		CH			
					4,6 debole	
				4,84 F	4,84 F	
				4,95 flesso		
5,76 F	5,76 F		C=O		5,78 f	
				5,98 larga	6 d	
6,85 f	6,85 f		CH_2, CH_3	6,85 larga	6,85 m	
7,25 m	7,25 m		CH_3	7,25 d		
7,85 d	7,85 d					
8,07 m	8,07 d		fosfolipidi			
8,55 m	8,55 d		esteri colestepilici	8,5 larga	8,5 m larga	
8,75 d	8,75 d					
8,9 d	8,9 d					
9,2 d	9,2 d			9,4 m larga	9,5 d larga	
	9,45 m		colesterolo			
9,7 d	9,7 d		»			
9,9 m	9,9 d		»			
10,15 d	10,15 d		»			
10,4 d	10,4 m		»			
10,95 d			»			
11,4 d	11,4 m		»			
11,9 d	11,9 m		»			
12,45 d	12,5 fm		»			
					10,3	
					10,9 d	
				12 d	11,4 d	
12,75 d				12,8 m (larga)	12,8 m (larga)	
13,8 mf	13,8 d		CH_2			

TABELLA XXII.

Assorbimenti delle frazioni lipidiche dai sieri di uomo normale e di portatore di tumore. (Ca.).

Frazione *A*		Assegnazione	Frazione *B*	
Normale	Ca.		Normale	Ca.
2,98 m	2,98 d	OH	3,02 mf	3,02 m
			3,1 d	
3,45 F	3,45 F	CH	3,45 f	3,45 F
3,52 m	3,52 m	CH	3,52 m	3,52 mf
			4,84 m	4,84 mf
5,76 F	5,76 F	C=O	5,76 F	5,76 F
6,85 f	6,85 f	CH_2, CH_3	6,85 f	6,85 f
7,25 m	7,25 m	CH_3	7,25 m	7,25 d
8,07 d	8,07 d	fosfolipidi	8,01 m	8,01 mf
		—	7,4 d	7,4 m
		—	7,75 d	7,75 m
8,45 m	8,45 m	esteri colesterilici, fosfolipidi		8,4 d
	8,55 d	esteri colesterilici, fosfolipidi	9,2 mf largo	9,2 mf largo
9,5 m	9,5 m	colesterolo		
	9,7 d	»		
9,9 d	9,9 d	»		
	10,3 d	lecitine		
		—	10,5 m largo	10,5 mf
		—	10,75 flesso	10,75 flesso
10,8 d	10,8 d			
11,4 d	11,4 d			11,25 debole
11,9 m	11,9 m	colesterolo	12,02 m	12,02 mf
12,5 m	12,5 m	»		
12,75 d	12,75 d	—	12,82 md	12,82 d
13,2 d	13,2 d	—		
13,78 mf	13,78 mf	CH_2	13,78 d	

La frazione VIII (alcool metilico) è qui molto abbondante ed è simile alla VII. Le lecitine però scompaiono quasi completamente; la banda a 4,84 μ è più intensa ed è sempre unica. Dal confronto delle frazioni VII e VIII, che sono costituite dagli stessi componenti (tra cui il componente che presenta l'assorbimento a 4,84 μ), ma in proporzioni diverse, e per analogia con quanto osservato per gli equini normali e con A. I., è possibile ricavare lo spettro del componente della frazione VI.

Gli assorbimenti sono allora (confrontati con quelli della fraz. VI provenienti dai lipidi serici di equini):

Uomo: 3,1 m 3,12 m 3,45 f 3,52 m 4,84 f circa 6 6,85 (largo) circa 8,2 9,3 fm (largo) 12,8 m.

Cavallo: 3,12 m 3,26 m 3,45 F 3,52 m 4,84 F 5,98 (largo) 6,85 (largo) 8,2 (largo) 9,4 m (largo) 12 d 12,8 (largo).

Come si vede l'analogia è notevole e permette di concludere che si tratta o dello stesso composto o di una stessa classe di composti. Come è noto infatti, al di sopra di un certo peso molecolare, normalmente non troppo elevato, gli spettri I. R. nella regione fino a 15 μ non si differenziano per i vari composti di una serie omologa.

Questo fatto, se costituisce una difficoltà notevole per la determinazione della struttura di uno di tali composti chimici, può essere invece applicato con vantaggio allo studio di miscele complesse, come si hanno nei lipidi, per cui dalla presenza di una banda è possibile stabilire la presenza di una determinata serie di composti: per esempio grassi, lecitine, esteri colesterilici, ecc.

La frazione IX è qui presente in quantità tale da poter venire analizzata spettrofotometricamente (fig. 13).

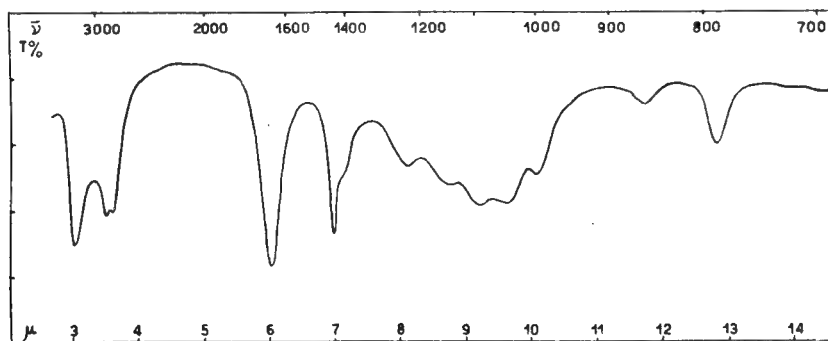



Fig. 13.
Curva di trasmissione della frazione cromatografica IX dei lipidi serici umani.

I suoi assorbimenti sono i seguenti:

3,03 *F* (larga) 3,45 *f* 3,52 *d* 6 *F* (molto larga) 6,85 *m* 7,25 *d* 8,07 *m* 8,63 *m* 9,27 *f* (larga) 9,62 *f* (larga) 10,1 *m* 11,22 *d* 12,8 *m*.

Sono ancora presenti le lecitine, però il costituente maggiore è diverso e potrebbe anche essere qualche derivato di carboidrati. Del resto questa frazione è solubile oltre che nell'alcool metilico ed etilico anche in acqua con colorazione gialla.

È interessante osservare che anche in queste frazioni compare la banda a circa 12,8 μ di media intensità. Ciò spiega le variazioni nel rapporto tra le intensità della banda a 4,8 μ e circa 12,8 μ che si osservano in taluni estratti lipidici totali o comunque non frazionati cromatograficamente in modo completo.

Lipidi estratti dagli eritrociti di uomo portatore di tumore.

Nella tabella XXIII sono riportati gli assorbimenti delle frazioni *A* e *B*, mentre per quanto riguarda le nove frazioni ottenute da queste si può osservare quanto segue.

TABELLA XXIII.

Assorbimenti delle frazioni lipidiche dagli eritrociti umani di portatore di tumore.

Frazione *A*	Assegnazione	Frazione *B*
2,98 m	OH	3 m
	—	3,05 m
3,45 F	CH	3,45 f
3,52 m	CH	3,52 m
	—	4,78 f
5,76 F	C=O	5,76 F
	—	6,1 m
6,85 f	CH_2, CH_3	6,85 f
7,25 m	CH_3	7,25 m
	—	7,4 d
7,8 m	—	7,8 m
	—	8,07 m
8,4 d	—	8,4 d
8,55 d	esteri colesterilici	
8,75 d	—	
9 d	—	
	—	9,2 mf largo
9,3 d	—	
9,45 m	fosfolipidi	
9,75 m	—	
10,3 d	-	
10,4 m	colesterolo	
	—	10,5 m
10,6 d	colesterolo	
10,8 d	»	
11,3 d	»	11,3 m
11,9 m	»	
12,5 m	»	12,1 mf
12,8 d	»	12,8 mf
13,5 m	»	
13,78	CH_2	13,78

La prima frazione è scarsissima e costituita essenzialmente da grassi saturi.

Nella seconda frazione il costituente più abbondante è il colesterolo; la III è costituita unicamente dal colesterolo e così pure la IV quando si ottiene.

La frazione V è normalmente assente.

La frazione VI in piccola quantità è costituita dal componente rosso. Non siamo però finora riusciti a registrarne lo spettro.

La frazione VII è simile all'VIII sebbene i vari componenti vi siano contenuti in proporzioni diverse. Anche qui per confronto si possono dedurre, come già indicato per i lipidi del siero umano, alcuni assorbimenti del componente rosso. Questi risultano gli stessi già elencati precedentemente con l'unica differenza rappresentata dallo spostamento a 4,78 μ dell'assorbimento caratteristico, il quale sembra presentare inoltre un'altra debole banda dal lato delle frequenze minori.

La IX frazione è sempre assai scarsa.

Anche nel caso dei lipidi dai globuli rossi i costituenti fondamentali sono gli stessi. La quantità di lipidi totali estratta è inferiore rispetto a quella ottenuta dal siero e si ha una notevole percentuale di colesterolo; le lecitine sono più abbondanti mentre scarseggiano gli esteri di acidi grassi (e ciò forse in relazione alla notevole quantità di colesterolo). Il componente responsabile dell'assorbimento a 4,8 μ è presente in percentuale leggermente inferiore a quella che si ha nel caso di lipidi da sieri di portatori di tumore. Va però tenuto presente che tale percentuale è valutata approssimativamente dall'intensità della banda a 4,78 μ confrontata coll'intensità della 4,84 μ. Dato però che i composti responsabili delle due bande sono diversi (pur appartenendo probabilmente alla stessa classe) questa valutazione potrebbe essere erronea per il fatto che possono essere diversi i loro coefficienti d' estinzione.

Ricordiamo infine che anche l'aspetto della banda è cambiato: la banda a 4,78 μ è infatti molto più larga che non quella a 4,84 μ come già è stato detto.

Il frazionamento cromatografico viene quindi a confermare quanto da noi è stato esposto nel Cap. II ed anzi le opinioni allora espresse vengono a essere considerevolmente rafforzate in conseguenza dei maggiori dettagli che si sono potuti per tale via studiare circa la composizione degli estratti lipidici totali.

Possiamo quindi ripetere ancora una volta che le classi dei costituenti di queste miscele risultano in ogni caso qualitativamente le stesse anche se i rapporti sono talvolta molto variabili.

Il frazionamento cromatografico descritto ha permesso di isolare il componente responsabile dell'assorbimento a 4,84 μ che è risultato una

sostanza intensamente colorata in rosso, di cui stiamo ora studiando le proprietà e le caratteristiche chimiche.

Pure rossa e di aspetto assai simile è la sostanza isolata per la stessa via dagli eritrociti, la quale come già è stato detto presenta l'assorbimento caratteristico a 4,78 μ. Delle frazioni cromatografiche isolate col metodo descritto cercheremo di stabilire in seguito le proprietà immunochimiche.

CAPITOLO V.

Ricerche sui lipidi degli elementi cellulari di tessuti umani normali e tumorali.

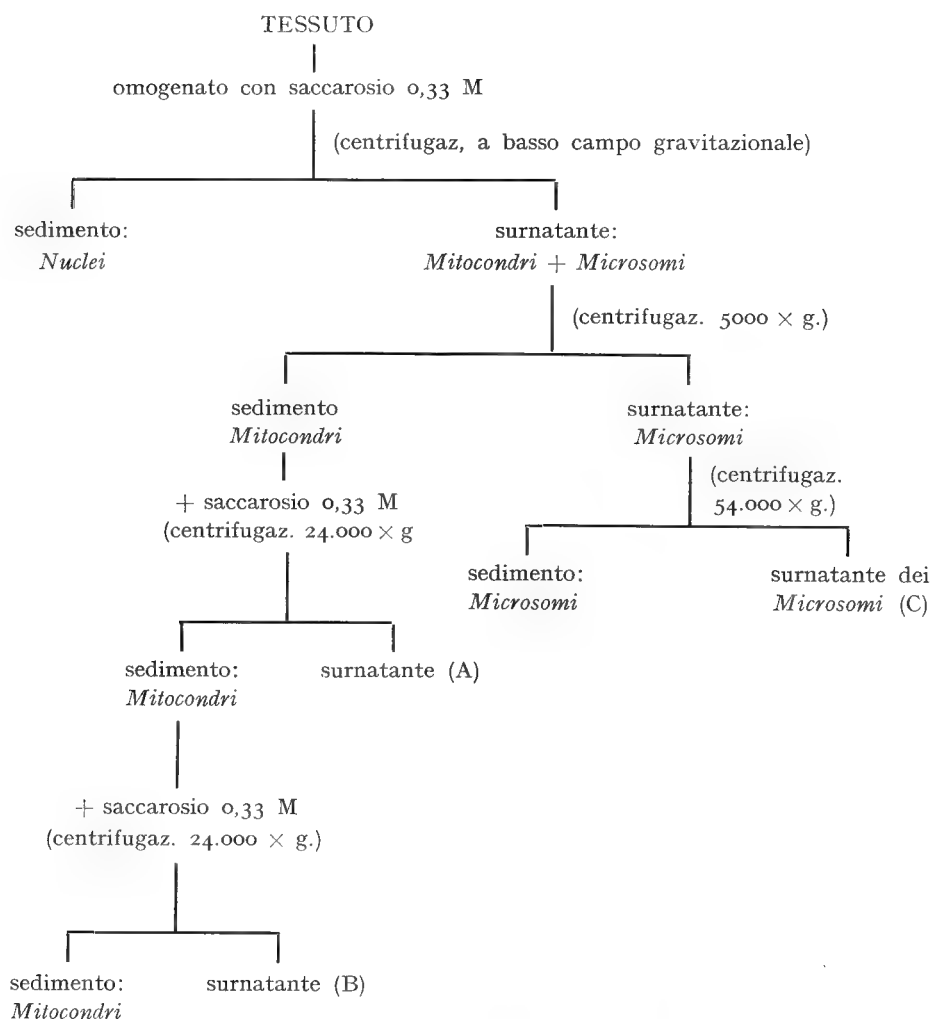
Il reperimento nei sieri e negli eritrociti di portatori di tumore di composti lipidici dotati di attività antigenica, e che attraverso un opportuno metodo sierodiagnostico si dimostrano capaci di reagire direttamente contro i sieri di portatori di tumori (senza far ricorso ad induzione sperimentale di anticorpi per inoculazione in animali), ci ha spinto ad intraprendere un'analoga ricerca di queste sostanze anche nei tessuti, ed in particolare negli elementi strutturali della cellula (nuclei, mitocondri, microsomi). È ben noto che questi elementi cellulari cui sono legate complesse attività ed un profondo significato nelle reazioni vitali della cellula, mostrano talvolta un forte contenuto lipidico (68), che nei microsomi raggiunge circa il 40% (69). È stato inoltre recentemente messo in evidenza il particolare interesse che presentano questi elementi anche da un punto di vista immunochimico in considerazione della reattività specifica dimostrata dai mitocondri neoplastici nell'allestimento di sieri iperimmuni, che a loro volta risultano particolarmente reattivi verso antigeni costituiti da lipidi serici tumorali (60, 61) e della constatazione fatta da Zilber (62) sulla esistenza nella frazione mitocondriale e nei microsomi di un antigene specifico delle cellule tumorali che l'Autore ritiene essere probabilmente un componente proteico specifico.

Seguendo il metodo di Hogeboom (70) abbiamo eseguito un frazionamento all'ultracentrifuga di omogenati di tessuti normali e tumorali (carcinoma ovarico e adeno-carcinoma mammario), impiegando una supercentrifuga PHYWE mod. 93 refrigerata, secondo lo schema che riportiamo in Tab. XXIV. Gli omogenati del tessuto normale e patologico sono stati successivamente sottoposti a campi gravitazionali diversi ottenendosi la separazione di nuclei, mitocondri e microsomi.

Ciascuna di queste entità costitutive è stata sottoposta ad estrazione con CS_2 e acetone secondo le modalità già specificate.

Segnaliamo che per un controllo del contenuto lipidico totale dei tessuti, è stato sottoposto ad analoga estrazione previa liofilizzazione, anche il surnatante dei microsomi C, come pure il tessuto adiposo di riserva, che in qualche caso si è presentato particolarmente abbondante.

TABELLA XXIV.

Schema di frazionamento con l'ultracentrifuga per la separazione dei nuclei, mitocondri e microsomi.

Gli estratti ottenuti da ciascuno dei costituenti cellulari e dal surnatante dei microsomi sono stati sottoposti ad un esame spettrofotometrico nell'infrarosso.

Gli spettri presentano tutti gli assorbimenti normalmente riscontrati per gli estratti lipidici totali sin qui esaminati, ed in particolare l'assorbimento a 4,84 μ (fig. 14).

Possiamo segnalare che gli estratti dai mitocondri e dai microsomi hanno presentato spettri infrarossi assolutamente uguali non solo per la

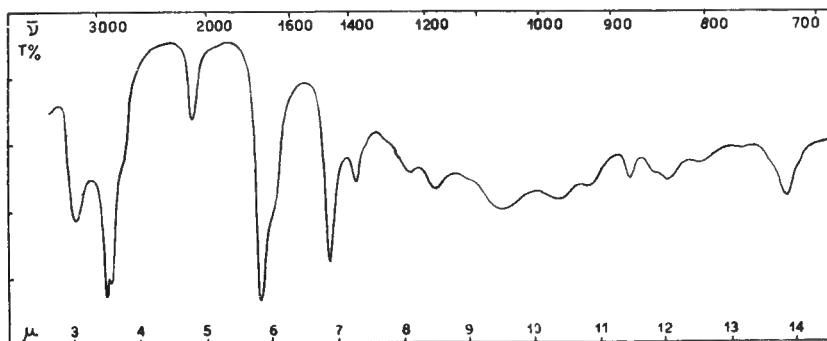



Fig. 14.
Curva di trasmissione degli estratti lipidici totali dai mitocondri.

posizione ma anche per l'intensità delle bande (v. tabella XXV), mentre quelli dei nuclei e del surnatante dei microsomi si differenziano per una minor intensità dell'assorbimento a 4,84 μ.

TABELLA XXV.

Assorbimenti dei lipidi estratti dai mitocondri e microsomi di tessuto tumorale umano.

	Assegnazione
3 m	OH
3,45 f	CH
3,52 m	CH
~ 4,8 m (larga)	—
5,76 F	C=O
6,87 f	CH_2
7,27 m	CH_3
8,07 m	fosfolipidi
8,45 m	esteri colesterilici - grassi
9,45 m (larga)	fosfolipidi
10,3 d	lecitine
10,77 d	colesterolo
11,44 d	colesterolo
11,98 d	colesterolo
13,87 m	grassi - esteri colesterilici - fosfolipidi

Facciamo tuttavia presente che queste ultime osservazioni sono puramente indicative, poichè i casi finora esaminati sono pochi; l'intensità della

banda a 4,84 μ è risultata in ogni caso troppo debole per permettere delle osservazioni sicure, e ciò soprattutto quando sono presenti notevoli quantità di sostanze grasse, come si è verificato talvolta, le quali impartiscono allo spettro le loro caratteristiche fondamentali.

È inoltre ben noto che il metodo di isolamento di queste entità cellulari consente di ottenere delle frazioni di omogeneità citologica e biochi. mica discutibile, per cui sarà necessario prendere in considerazione particolari metodi chimici per uno studio più preciso ed esauriente sulle differenze di concentrazione e delle classi di lipidi contenute in ciascuna di esse-

Capitolo VI.

Ricerche sui lipidi del siero e degli eritrociti di vari animali.

È noto che le determinazioni dei lipidi del sangue sono state eseguite non solo sull'uomo in condizioni normali e patologiche, ma anche su numerose specie animali soprattutto da Boyd (71) e Abderhalden (72), i quali ne hanno definito il contenuto medio totale e la composizione percentuale rispetto ai costituenti normali (grassi neutri, acidi grassi totali, colesterolo totale libero ed esterificato, fosfolipidi) nel siero, nel plasma e negli eritrociti.

Burt e Rossiter (73) hanno stabilito la composizione in lipidi dei leucociti del coniglio confrontandola con quella dei corrispondenti eritrociti.

Nel corso di tali studi i diversi Autori hanno constatato che le classi di lipidi che si ritrovano nelle diverse specie animali sono fondamentalmente eguali, verificandosi solo differenze quantitative; possono invece riscontrarsi forti variazioni sia nelle quantità relative come pure nel contenuto totale dei lipidi di una stessa specie; ed inoltre il contenuto lipidico del siero e del plasma è sempre sensibilmente diverso da quello dei globuli rossi.

È stato inoltre accertato che gli eritrociti sono praticamente privi di grassi neutri (74), mentre questi ultimi vi si trovano combinati con i fosfolipidi e in una certa misura anche con il colesterolo (75).

Contrariamente a quanto riscontrato nel plasma, nei globuli si troverebbero quantità di cefalina maggiori del contenuto in lecitine (76), ed alcuni ricercatori mettono addirittura in dubbio che la lecitina sia un componente degli eritrociti.

Yamakawa e Suzuki (77) hanno studiato i lipidi degli stromi di molte specie animali e dell'uomo con particolare riferimento ai glicolipidi; ed hanno inoltre isolato piccole quantità di acido emataminico e di esosamina.

Data l'analogia di composizione dei lipidi umani serici e tissurali con quelli corrispondenti provenienti dalle diverse specie animali, ab-

TABELLA XXVI.

Assorbimenti dei lipidi estratti da sieri e da eritrociti di animali diversi.

Cavia (siero)	Suino (siero)	Suino (eritrociti)	Vitello (siero ed eritrociti)	Montone (siero)	Capra (siero)	Assegnazione
3 m	3 m	3 m	3 m	3 m	3 m	OH
3,45 f	3,45 f	3,45 f	3,45 f	3,45 f	3,45 f	CH
3,52 m	3,52 m	3,52 m	3,52 m	3,52 m	3,52 m	CH
4,84 m	4,84 m	~ 4,8 d (larga)	4,84 m	4,84 m	4,84 m	
5,76 F	5,77 F	5,77 F	5,76 F	5,78 F	5,78 F	C=O
6,87 f	6,85 f	6,85 f	6,85 f	6,85 f	6,85 f	CH_2
7,27 m	7,26 m	7,26 m	7,26 m	7,25 m	7,25 m	CH_3
8,05 m	8,03 m	8,05 m	8,03 m	8,08 m	8,08 m	fosfolipidi
8,52 m	8,52 f	8,47 m	8,51 m	8,5 m	8,5 m	esteri colesterilici - grassi
8,78 m	8,85 d	8,84 m	8,82 m			
9,24 m	9,2 d		9,2 d	9,2 m	9,2 m	fosfolipidi
9,51 m	9,4 d	9,4 m	9,4 d	9,4 m	9,4 m	»
	9,83 d		9,87 d			colesterolo
	10,42 d	10,44 d	10,4 d	10,36 d	10,36 d	lecitine
10,81 d	10,82 d	10,8 d	10,8 d	10,8 d	10,8 d	colesterolo
11,33 d		11,5 d		11,44 d	11,44 d	»
11,85 d				11,78 d	11,78 d	»
12,08 m	12,1 d	12,1 d	12,08 m	12,1 d	12,1 d	
12,55 d	12,5 d	12,49 d	12,48 m			
12,73 m	12,78 d	12,98 d	12,8 d	12,75 d	12,75 d	
13,88 m	13,84 m	13,85 d	13,85 d	13,9 m	13,9 m	grassi - esteri colesterilici, fosfolipidi

biamo ritenuto opportuno indagare se il componente da noi individuato e che spettrofotometricamente è responsabile dell'assorbimento a 4,84 μ appartenesse al corredo lipidico normale non solo dei sieri e dei tessuti umani ed equini, ma anche di altre specie animali; abbiamo perciò effettuato delle estrazioni col metodo al CS_2 e acetone — già descritto — sui

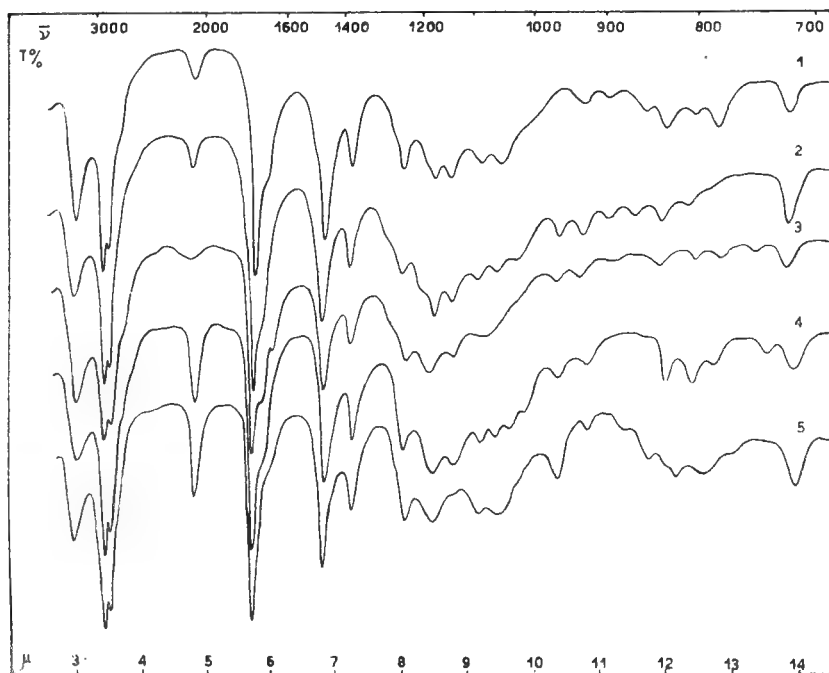



Fig. 15.

Curve di trasmissione degli estratti lipidici totali da: 1) siero di cavia; 2) siero di suino; 3) eritrociti di suino; 4) siero ed eritrociti di vitello; 5) siero di montone e di capra.

sieri e sugli eritrociti dei seguenti animali: bue, suino, capra, montone, cavia.

Ci è stato così possibile effettuare un confronto fra questi estratti e quelli provenienti dai sieri e dai tessuti umani normali e di portatori di tumore, dagli equini sani e con A. I.

Riportiamo in Tab. XXVI gli esiti degli esami spettrofotometrici nell'I. R. (fig. 15).

Come si vede anche per tutti questi animali la composizione nei costituenti principali degli estratti lipidici è qualitativamente uguale a quella riscontrata per l'uomo e per il cavallo.

Anche il componente che assorbe a 4,84 μ è presente in concentrazione variabile da caso a caso; possiamo unicamente segnalare che nella cavia

è sempre stata riscontrata una intensità piuttosto debole della banda caratteristica.

Anche il comportamento nella separazione cromatografica segue le linee generali già descritte; in particolare la frazione VI è costituita dalla

TABELLA XXVII.

Assorbimenti dei lipidi estratti dai sieri e dagli eritrociti della capra n. 84 e del vitello n. 85.

Estratto totale	I frazione
3 m	
3,45 f	3,45 f
3,53 m	3,51 m
4,84 m	—
5,27 m	5,27 m
5,78 F	5,78 F
5,95 m	—
6,29 m	6,29 m
6,72 f	6,72 f
6,8 m	6,8 m
6,94 m	6,94 m
7,1 m	7,1 m
7,28 d	7,28 d
7,9 d	7,9 d
8,07 d	8,07 d
8,42 d	8,42 d
9,02 d	9,02 d
9,15 f	9,15 f
9,5 m	9,5 m
9,63 m	9,63 m
9,85 f	9,85 f
10,3 m	10,3 m
10,59 m	10,59 m
11,22 m	11,22 m
11,95 f	11,95 f
12,15 m	12,15 m
12,36 d	12,36 d
12,92 F	12,92 F
13,3 f	13,3 f
13,64 m	13,64 m
14,08 f	14,08 f
14,53 m	14,53 m
14,82 m	14,82 m

sostanza rossa che presenta gli stessi assorbimenti nell'infrarosso di quella estratta dai sieri dei cavalli normali e colpiti da A. I.

Occorre però osservare che in due soli casi, dei numerosi esaminati, e precisamente per i lipidi estratti dal siero e dagli eritrociti di una capra (84 A e 84 B) e di un vitello (85 A e 85 B) lo spettro infrarosso ha rivelato la presenza di uno o più componenti completamente diversi da quelli fin qui segnalati, come risulta dalla tabella XXVII.

È stato possibile isolare queste sostanze per cromatografia: sciogliendo l'estratto lipidico totale in acetone ed eluendo su colonna di silice con ace-

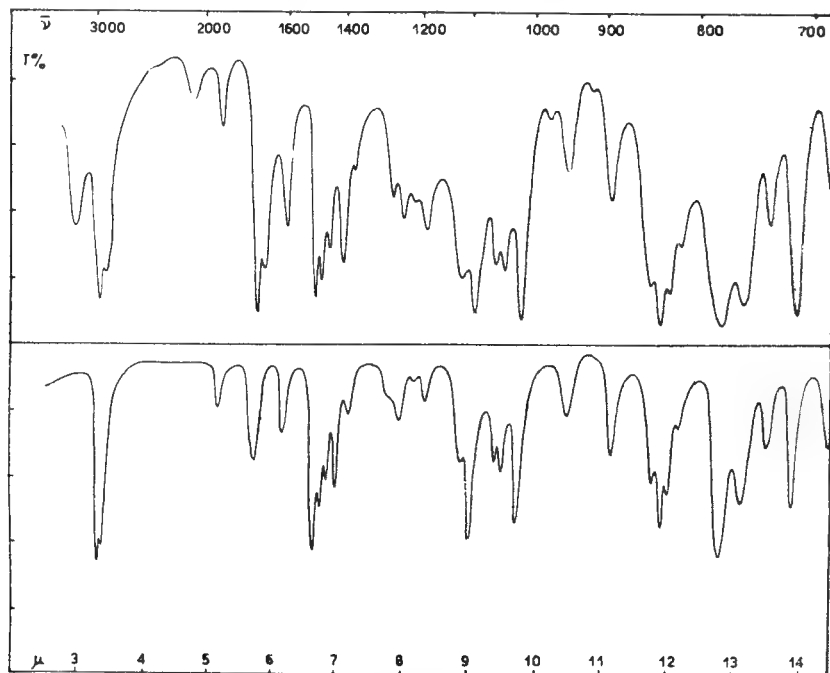



Fig. 16.

Curve di trasmissione degli estratti lipidici da siero ed eritrociti del vitello n. 84 e della capra n. 85. In alto: estratto totale. In basso: I frazione.

tone esse passano nelle prime frazioni. Il loro spettro è pressochè identico a quello dello spettro dell'estratto totale differenziandosene quasi unicamente per la mancanza dell'assorbimento a 4,84 μ, il che conferma che in questi casi tali sostanze sconosciute sono i costituenti principali (fig. 16).

È stato tuttavia possibile anche in questi casi riscontrare la presenza dei componenti normali lipidici in concentrazioni molto più basse del solito.

In particolare la frazione rossa si ottiene dopo l'eluzione delle prime frazioni con acetone e le ultime frazioni normali per eluzione con alcool metilico.

Poichè ad eccezione di queste sostanze insolite gli altri componenti degli estratti lipidici totali sono gli stessi, non si potrebbe escludere a priori che quelle non siano presenti normalmente in concentrazioni basse in tutti gli estratti.

Ricerche ulteriori sulla natura di queste sostanze non si poterono condurre poichè tali anomalie non furono mai più riscontrate.

Capitolo VII.

Ricerche sulla costituzione di alcuni antigeni lipidici.

Nella relazione presentata alla XXIV Sessione dell'Office International des Epizooties (5) prospettavamo, in base a considerazioni di ordine chimico, un'analogia di costituzione, e quindi di reattività, fra l'antigene da noi estratto dai sieri degli equini colpiti da A. I. e l'antigene di Wassermann « cardiolipina » (usato per la sierodiagnosi della lue).

Abbiamo successivamente esteso queste stesse considerazioni anche agli antigeni tumorali, ed abbiamo già riferito in una nota successiva (46) anche sul comportamento immunochimico di questi tre antigeni in saggi sierologici crociati secondo lo schema:

— antigene lipidico A. I. contro siero di portatore di tumore = reazione positiva;

— antigene lipidico da siero di portatore di tumore contro siero equino A. I. = reazione negativa;

— antigene « cardiolipina Behring » contro siero equino A. I. = = reazione positiva.

Per meglio stabilire il significato di questi primi saggi si è reso necessario estendere la comparazione indagando anche sulla composizione chimica di altri antigeni lipidici, in particolare quelli normalmente impiegati nella sierodiagnosi della lue e l'antigene universale di Kahn.

Questi confronti ci sono parsi un indispensabile orientamento, non solo per poter iniziare uno studio sul valore immunochimico dei singoli componenti che compaiono in questi diversi antigeni (normalmente di costituzione piuttosto complessa), ma anche per consentire una effettiva valutazione del fenomeno immunologico riscontrato nei tumori e nell'anemia infettiva degli equini.

Infatti, da un punto di vista strettamente chimico-fisico le interazioni fra biopolimeri che si concretano in reazioni sierologiche di tipo precipitante o flocculante nelle quali i reagenti sono costituiti da antigeni e da anticorpi proteici sono state ampiamente studiate con i più moderni metodi di ricerca (elettroforesi, supercentrifugazione, microscopio elettro-

nico, film monomolecolari; diffusione e precipitazione in mezzi gelificati, isotopi radioattivi ecc.), che hanno portato all'individuazione delle condizioni in cui la reazione può effettivamente esplicarsi, a concetti di valenza degli antigeni e degli anticorpi, e con antigeni sintetici si è soprattutto riusciti a meglio definire il concetto di specificità degli anticorpi verso gruppi ben definiti della molecola antigenica.

Notevolmente più complesso e non ancora chiarito è invece il meccanismo di reazione quando si usino apteni lipidici sul tipo di quelli da noi isolati; infatti nella stessa reazione di Wassermann la cui importanza diagnostica è ormai indiscussa, i sistemi cardiolipina-siero luetico studiati con la tecnica dei film monomolecolari da Doty e Schulman (77 bis) non hanno permesso di stabilire l'esistenza di una associazione specifica fra i film dell'antigene cardiolipina-lecitina-colesterolo in varie proporzioni e le proteine seriche del luetico, essendo l'associazione riscontrata di entità eguale a quella di un siero normale, mentre inspiegabilmente nella reazione di Kahn l'antigene suddetto mostra un adsorbimento specifico verso una proteina globulare. Malgrado queste difficoltà di interpretazione, sono ormai divenuti di pratica comune ed hanno un indiscusso valore biochimico tutta una serie di antigeni lipidici ottenuti per estrazione dai diversi organi (antigeni di Wassermann, Kahn, Forssman ecc.), che manifestano ben determinate reattività zoospecifiche, organospecifiche, e reattività particolari di gruppo sanguigno (64, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84).

È noto inoltre che possono pure presentare reattività « in vitro » composti chimici ben definiti, quali acido oleico-oleato di sodio in presenza di lecitina.

Tra tutti gli apteni di estrazione menzionati sopra i più studiati dal punto di vista chimico sono indubbiamente quelli impiegati nella sierodiagnosi secondo Wassermann, ed in particolare la cardiolipina, dalla quale Pangborn (85), per idrolisi alcalina, ha potuto isolare acido oleico, glicerolo, acido linoleico e un poliestere dell'acido glicerofosforico.

Se è difficile stabilire il ruolo esplicato nelle reazioni « in vitro » (86) dai sistemi lipidici reattivi, maggiori difficoltà subentrano quando si vogliono accertare le loro proprietà immunochimiche « in vivo »; è infatti noto che l'inoculazione di soli lipidi in animali da esperimento non è in grado di evocare una risposta anticorpale, mentre questa si determina se contemporaneamente viene iniettata una proteina, come hanno dimostrato Landsteiner e Simms (87).

Le più recenti ricerche nel campo dell'oncologia hanno messo in evidenza come già si è detto la possibile esistenza di antigeni lipidici cui sarebbe legata l'insorgenza o la predisposizione ai tumori secondo tre possibili concetti: l'antigene è prodotto dal tessuto normale di portatori di tumore o di individui ad esso predisposti; oppure l'antigene è collegato

Tabella XXVIII.

Assorbimenti di alcuni antigeni lipidici.

Cardiolipina	Treponina	Kahn	Assegnazione
3 m	2,98 m	3 m	OH
3,45 f	3,45 f	3,45 f	CH
3,5 m	3,52 m	3,52 m	CH
4,84 d	4,78 m		
5,76 F	5,8 F	5,77 F	C=O
		6,28 d	
6,85 f	6,85 f	6,87 f	CH_2
		7,06 d	
7,27 m	7,25 m	7,25 m	CH_3
8,06 m	8,03 m	8,1 m-f	fosfolipidi
8,35 d	8,4 d		colesterolo
8,6 d	8,6 d		»
		8,88 d	
9,2 m	9,2 d	9,2 m-f	fosfolipidi
9,4 m	9,36 d	9,48 m-f	»
9,7 d	9,68 d		colesterolo
9,8 d			»
10,1 d			»
10,3 d		10,3 m-f	lecitine
	10,48 m		
10,73 d		10,8 m	colesterolo
11,4 d		11,4 d	»
11,88 m	11,87 m		»
		12,05 m	»
12,45 m		12,48 d	»
13,5 d		12,92 d	»
13,88 d	13,87 m	13,88 m	grassi

alla presenza di un agente cancerigeno, oppure viene prodotto dal tumore stesso (88).

A sostegno di quest'ultima ipotesi ricordiamo i lavori di Graham e Graham (89) i quali hanno osservato che nel 12% dei casi di portatori di determinati tipi di tumori umani si riscontra una reattività immunochimica fra l'antigene lipidico estratto da un tumore ed il siero del soggetto portatore del tumore stesso, reattività che si manifesta in una reazione di deviazione del complemento.

Per tutte le considerazioni che scaturiscono dalla disamina degli argomenti qui esposti, abbiamo sottoposto ad esame spettrofotometrico l'antigene di Wassermann cardiolipina « Behring » e « Sclavo », l'antigene di

Kahn e antigeni lipidici estratti da sieri di portatori di sifilide sierologicamente reattivi.

Ci è parso inoltre interessante stabilire se nelle sospensioni del treponema di Reiter (antigene Treponina della Sclavo) fossero presenti dei lipidi di costituzione analoga a quelli della Cardiolipina. A tale scopo abbiamo isolato per centrifugazione i treponemi e il surnatante, che sono stati poi sottoposti ad estrazione con CS_2 e acetone (il surnatante è stato previamente sottoposto a liofilizzazione). Mentre abbiamo constatato che i treponemi non forniscono quantità apprezzabili di lipidi, il surnatante invece se ne dimostra particolarmente ricco e sottolineiamo il fatto che esso manifesta una reattività sierologica analoga a quella della Cardiolipina; fenomeno questo sul quale stiamo ulteriormente indagando, poichè potrebbe condurre ad una revisione del concetto corrente di esistenza nel treponema di un componente proteico specificamente reattivo « in vitro » con l'anticorpo corrispondente.

Come si vede dalla Tab. XXVIII gli assorbimenti per gli antigeni Cardiolipina e Treponina sono gli stessi di quelli degli estratti lipidici finora descritti; in particolare è costantemente presente la banda a 4,84 μ (in qualche caso a 4,78 μ). (Fig. 17).

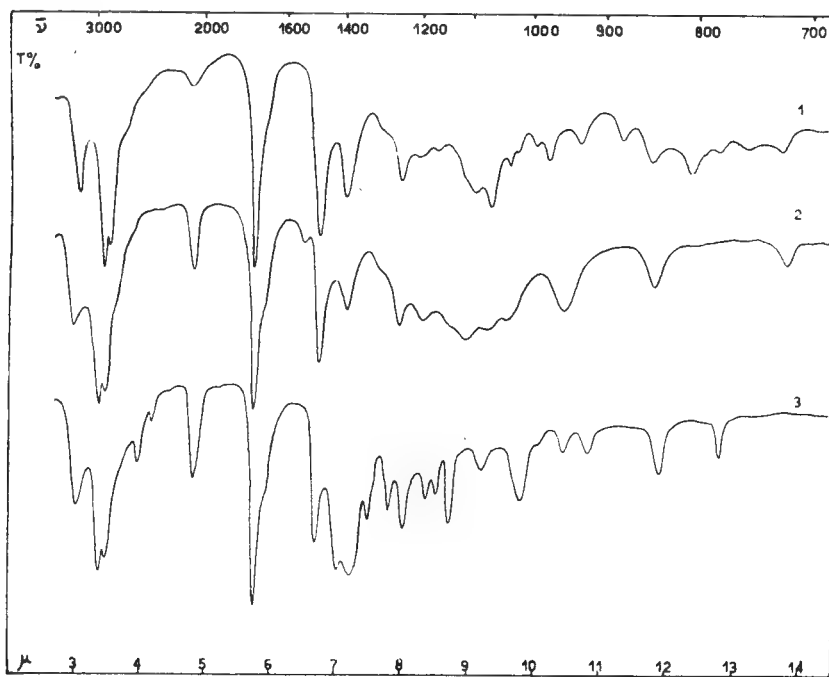



Fig. 17.

Curve di trasmissione di: 1) Cardiolipina; 2) Treponina; 3) Treponina n. 28.

L'intensità di questa banda nella Cardiolipina è risultata sempre molto bassa, mentre per la Treponina ha press'a poco lo stesso valore che ha nei lipidi estratti da sieri di portatori di tumore.

Dobbiamo ancora osservare che per la Treponina abbiamo ottenuto in un caso (n. 28) uno spettro (v. fig. 17) che presentava alcuni assorbimenti diversi da quelli elencati nella tabella; e precisamente (fig. 17):

7,1 μ f
9,2 μ d
9,83 μ m
11,92 μ m
12,88 μ m.

Questi assorbimenti sono già stati riscontrati negli spettri 84 e 85 (rispettivamente vitello e capra) riportati nella Tab. XXVII.

Anche l'estratto lipidico da un siero di sifilitico con reazione di Wassermann nettamente positiva (+ + + +) presentava sostanzialmente lo spettro normale; la banda a 4,84 μ aveva all'incirca la stessa intensità riscontrata negli estratti lipidici da siero umano normale.

Alquanto diverso è lo spettro dell'antigene di Kahn (v. Tab. XXVIII e fig. 18), nel quale, pur essendo ancora presenti gli assorbimenti dovuti

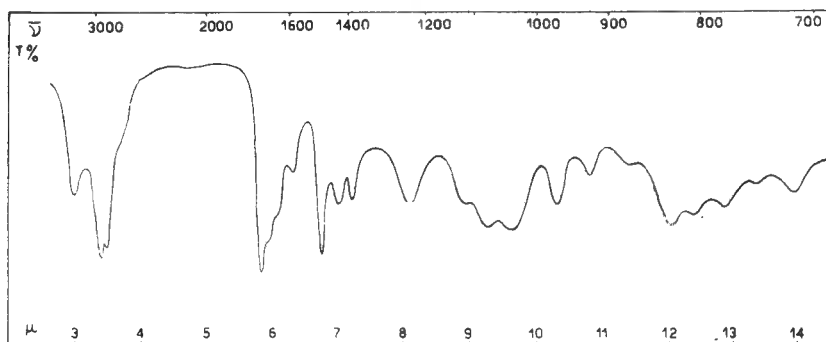



Fig. 18.
Curva di trasmissione dell'antigene di Kahn.

ai costituenti normali dei lipidi (colesterolo, lecitina, fosfolipidi, grassi), si nota l'assenza dell'assorbimento a 4,8 μ e la presenza di uno o più componenti di natura non ancora definita, ma che potrà essere meglio precisata con un opportuno frazionamento; facciamo infatti notare che il metodo da noi già usato in altri casi, non dà per l'antigene di Kahn alcun risultato.

Capitolo VIII.

Estratti lipidici da frazioni di salatura di sieri animali.

La distribuzione dei lipidi nelle lipoproteine extracellulari, nel plasma e nel siero umano normale, è stata determinata, mediante separazioni elettroforetiche, da Blix, Tiselius e Svensson (90) ed è stata effettuata anche su sieri di soggetti in diversi stati patologici. Si è potuto accertare che la maggior parte dei lipidi è veicolata da due ben definite frazioni elettroforetiche, le α- e le β- globuline. Queste stesse osservazioni sono state confermate anche da Gurd, Oncley, Edsall e Cohn (91) i quali hanno meglio precisato, attraverso misure di mobilità elettroforetica, che le due frazioni plasmatiche più ricche in lipidi sono le α_1-globuline, costituite per il 35% da lipidi, e le β_1-globuline, che ne contengono il 75%.

Questi stessi AA. hanno inoltre riscontrato che, dal punto di vista della solubilità, le lipoproteine plasmatiche presentano i caratteri tipici delle proteine, come pure è analoga la risposta a variazioni di pH, di forza ionica, e all'azione della glicina e dell'etanolo.

Macheboeuf e Rebeyrotte (92) hanno segnalato la possibilità di ottenere dai sieri di equini, per precipitazione con $(NH_4)_2SO_4$ e successiva denaturazione acida, una frazione lipoproteica che essi hanno chiamato cenapsi acida (C. A.), in cui la parte lipidica è costituita essenzialmente da lecitina ed esteri del colesterolo e che non contiene altre classi di lipidi. La C. A. si presenta come un componente elettroforetico omogeneo con mobilità molto prossima a quella dell'albumina cristallizzata. Dopo estrazioni dei lipidi, la parte proteica che resta della C. A. si dimostra ancora omogenea, ma la sua mobilità non si identifica nè con quella della sieroalbumina cristallizzata, nè con quella di nessun'altra globulina nota.

Sembra quindi che le cenapsi acide costituiscano una classe particolare di lipoproteine.

Riprendendo l'osservazione di Gurd e Coll., sull'identità di comportamento, per quanto riguarda i fenomeni di precipitazione frazionata per salatura, fra proteine e lipoproteine seriche, abbiamo ritenuto opportuno accertare se i lipidi da noi estratti e responsabili dell'assorbimento a 4,84 μ fossero contenuti nei sieri sotto forma di lipoproteine con caratteri di solubilità diversi da quelli finora segnalati.

Abbiamo perciò sottoposto a frazionamento per salatura col metodo di Derrien da noi modificato (v. Cap. I) sieri di equini colpiti da anemia infettiva e siero equino normale di controllo. La serie dei precipitati così ottenuti è stata sottoposta ad estrazione col sistema CS_2 e acetone, ed i lipidi estratti presentano nell'I. R. gli assorbimenti indicati nella Tab. XXIX.

Si è anche cercato di valutare approssimativamente l'intensità a 4,84 μ, ed allo scopo si è ritenuto opportuno confrontare la densità ottica

TABELLA XXIX.

Assorbimenti dei lipidi delle frazioni di salatura ottenute da siero equino con A. I.

0-38 %	38-40 %	40-43 %	43-49 %	49-52 %	52-61 %	61-69 %	69-90 %
3,03 m	2,99 m	3,01 m	2,98 m	2,99 m	2,98 m	3 m	3 m
3,45 f	3,45 f	3,45 f	3,45 f	3,45 f	3,45 f	3,45 f	3,45 f
3,51 m	3,52 m	3,5 m	3,52 m	3,52 m	3,5 m	3,5 m	3,51 m
4,84 d	4,84 m	4,84 m	4,84 d	4,84 m	4,84 d	4,84 d	4,84 m
5,76 F	5,76 F	5,76 F	5,76 F	5,76 F	5,76 F	5,76 F	5,76 F
6,87 f	6,87 f	6,87 f	6,85 f	6,85 f	6,85 f	6,85 f	6,86 f
7,27 m	7,27 m	7,25 m	7,27 m	7,25 m	7,25 m	7,25 m	7,26 m
8,09 m	8,08 m	8,02 m	8,1 m	8,05 m	8,02 m	8,05 m	8,08 m
8,54 m	8,52 m	assorbimento molto largo non risolto	8,5 d	8,51 m	8,52 m	8,51 m	8,39 m
							8,53 m
9,2 d			9,2 d	9,2 d	9,2 m	9,2 m	9,17 m
9,4 d	9,4 d		9,4 d	9,4 d	9,4 m	9,38 m	9,4 m
9,88 d	9,88 d		9,9 d	9,8 d	9,89 m	9,8 m	
10,06 d	10,05 d						
10,81 d			10,3 d	10,3 d	10,3 m	10,29 m	10,33 m
11,44 d				10,8 d	10,83 d	10,85 d	10,88 d
12 d	12,01 d				12,1 d		
12,51 d	12,6 d				12,51 d		

Gli spettri dei lipidi estratti dalle frazioni del siero di cavallo normale sono qualitativamente uguali a quelli delle corrispondenti frazioni ottenute dal siero infetto.

determinata col metodo della « linea base » sulla banda a 4,84 μ con quella, determinata con lo stesso metodo, sulla banda a 3,45 μ, assumendo che l'intensità di quest'ultima resti all'incirca costante nei lipidi delle diverse frazioni esaminate. Nella Tab. XXX sono riportati i valori di $R = \frac{D_{4,84}}{D_{3,45}}$ per tutte le frazioni ottenute dai due sieri, normale e con A. I.

TABELLA XXX.

	Cavallo A. I.	Cavallo normale
Fraz. 0-38 %	0,04	0,2
» 38-40 %	0,4	(*)
» 40-43 %	0,2	0,8
» 43-49 %	0,04	0,15
» 49-52 %	0,16	0,6
» 52-61 %	0,06	0,27
» 61-69 %	0,06	0,14
» 69-90 %	0,4	0,1

Dall'osservazione di questa tabella si ricava quanto segue:

a) per il cavallo colpito da A. I., si notano 3 massimi nei valori di R in corrispondenza delle frazioni 38-40%, 49-52% e 69-90%; mentre per la I e la III frazione, R assume valori press'a poco eguali, per la II è leggermente inferiore alla metà;

b) per il cavallo normale si notano solo due massimi in corrispondenza delle frazioni 40-43% e 49-52% (come già segnalato nella Tabella, ricordiamo ancora che per il cavallo normale non si è potuta esaminare la frazione 38-40%); il valore di R per quest'ultima è all'incirca i due terzi di quello della prima;

c) il valore di R dei primi due massimi è molto maggiore per il cavallo normale.

Segnaliamo che questi risultati si riferiscono a poche esperienze e ci ripromettiamo di controllarli ulteriormente, perchè l'esame di questi valori starebbe a dimostrare una diversa distribuzione nelle lipoproteine seriche del lipide responsabile dell'assorbimento a 4,84 μ nei sieri di equini normali e di equini colpiti da A. I.

Ringraziamo il prof. M. Milone per i consigli e gli incoraggiamenti datici durante l'esecuzione del presente lavoro.

Istituto di Chimica-Fisica dell'Università di Torino.

(*) Di questa frazione non si è potuto determinare lo spettro perchè molto scarsa.

BIBLIOGRAFIA

1. MILONE M., SERRA A., AMBROSINO C., GUARINI G., LIBERATORI J., « Atti Accad. Sci. Torino » 90, 243 (1955-56).
2. AMBROSINO C., LIBERATORI J., « Profilassi » 28, f. 3 (1955).
3. AMBROSINO C., LIBERATORI J., GUARINI G., « Giorn. Batter. Immunol. » 47, 303 (1954).
4. AMBROSINO C., LIBERATORI J., GUARINI G., « Bull. O. I. E. » 45, 200 (1956).
5. SERRA A., ITIKAWA O., GUARINI G., MILONE M., AMBROSINO C., LIBERATORI J., « Bull. O. I. E. » 46, 626 (1956).
6. TISELIUS A., KABAT E. A., « J. Exptl. Med. » 69, 119 (1939).
7. VAN DER SCHEER J., WYCKOFF R. W. G., CLARKE F. H., « J. Immunol. » 39, 65 (1940).
8. DREGUSS M. N., LOMBARD L. S., *Experimental studies in Equine Infectious Anaemia* ». Univ. of Pennsylvania Press, Philadelphia (1954), pag. 76.
9. GUARINI G., AMBROSINO C., LIBERATORI J., « Bull. O. I. E. » 45, 194 (1956).
10. DERRIEN Y., « Svensk Kem. Tid. », 59, 139 (1947).
11. DERRIEN Y., « C. R. Soc. Biol. », 139, 909 (1945).
12. ROCHE J., DERRIEN Y., « C. R. Soc. Biol. », 139, 813 (1945).
13. ROCHE J., DERRIEN Y., MANDEL S., « C. R. Soc. Biol. », 138, 635 (1944).
14. ROCHE J., DERRIEN Y., MANDEL S., « C. R. Soc. Biol. », 138, 600 (1944).
15. ROCHE J., DERRIEN Y., MANDEL S., « C. R. Soc. Biol. », 138, 651 (1944).
16. ROCHE J., DERRIEN Y., MANDEL S., « C. R. Soc. Biol. », 138, 655 (1944).
17. ROCHE J., DERRIEN Y., MANDEL S., « C. R. Soc. Biol. », 138, 676 (1944).
18. ROCHE J., DERRIEN Y., MANDEL S., « C. R. Soc. Biol. », 138, 515 (1944).
19. DERRIEN Y., HORBOE N., « C. R. Soc. Biol. », 144, 1654 (1950).
20. HAWK B., *Practical physiological chemistry*. J. e A. Churchill, London 1952, pag. 821.
21. BAKER M. C., CAMPBELL D. H., EPSTEIN S. I., SINGER S. J., « J. Am. Chem. Soc. » 78, 312 (1956).
22. BOYD W. C., *Fundamentals of immunology*. New York, Interscience Publ., 2ª ed., (1947).
23. DERRIEN Y., LAURENT G., REYNAUD J., « J. Chim. Phys. », 48, 651 (1951).
24. DERRIEN Y., LAURENT G., REYNAUD J., in *Quatrième Colloque de Physique Macromoléculaire*, Paris 5-7 Avril, 1951.
25. AMBROSINO C., LIBERATORI J., GUARINI G., « Giorn. Batter. Immunol. », 50, 35 (1957).
26. GUARINI G., AMBROSINO C., LIBERATORI J., « Giorn. Batter. Immunol. », (in corso di pubblicazione).
27. ANTWEILER H. J., « Kolloid Z. », 115, 130 (1949).
28. HAUROWITZ F., SOWINSKI R., H. FU CHENG, « J. Am. Chem. Soc. » 79, 1882 (1957).
29. ISHII S., TANAKA K., SONODA A., in *Exp. Rep. n. 29 of Gov. Exp. Stat. for Animal Hyg.* (Tokyo), Aprile 1955, pag. 99.
30. MACHEBOEUF, « Bull. Soc. Chim. Biol. » 14, 1168 (1932).
31. MACHEBOEUF, « Bull. Soc. Chim. Biol. » 13, 736 (1931).
32. BLOOR W. R., « J. Biol. Chem. » 49, 201 (1921).
33. BLOOR W. R., MC PHERSON D. J., « J. Biol. Chem. » 31, 79 (1917).

34. Bloor W. R., « J. Biol. Chem. » 77, 53 (1928).
35. Bang J., « Biochem. Z. » 91, 86; 235 (1918).
36. Monasterio G., « Boll. biol. sper. » fasc. 8, 1299 (1933).
37. Monasterio G., « Fisiol. e Medicina » 5, f. 7, 440 (1934).
38. Monasterio G., « Arch. Patol. e Clin. Med. » 6, 536 (1938).
39. Campana, « Policlinico » 6, 273 (1937).
40. Lorenzini ,« Giorn. Clin. Med. » 30, 1; 30 (1949).
41. Sperry W. M., Brand F. C., « J. Biol. Chem. » 213, 69 (1955).
42. Monasterio G., Gigli, « Rass. fisiopat. e clin. terap. », 19, 82 (1947).
43. Hamasato Y., « Tohoku J. Exptl. Med. » 52, 17 (1950).
44. Freeman N. K., Lindgren F. T., Yook C.ng, Nichols A. V., « J. Biol. Chem. » 203, 293 (1953).
45. Lindgren F. T., Elliott H. A., Gofman J. W., « J. Phys. Coll. Chem. » 55, 80 (1951).
45 bis - Borello E., Versino C., « Ricerca Scientifica », 26, 3405 (1956).
46. Milone M., Serra A., Ambrosino C., Borello E., Guarini G., Liberatori J., in *Osservazioni chimico-fisiche su alcune reazioni sierologiche.* (In corso di stampa sul « Giornale Accad. Medicina di Torino »).
47. Hirszfeld L., Halber W., « Zschr. f. Immunitätsforschr. » 67, 286 (1930); « Klin. Wchnschr. » 9, 918 (1930).
48. Hoyle L., « Am. J. Cancer » 39, 224 (1940).
49. Penn H. S., « J. Nat. Cancer Inst. », 12, 1389 (1952).
50. Penn H. S., Kaplan J., « Nature » 160, 18 (1947).
51. Hauschka T. S., « Cancer Res. » 12, 615 (1952).
52. Dowdy A. H., Penn H. S., Hall G., Bellamy A., « Proc. Am. Assoc. for Cancer Res. » 1, 12 (1954).
53. Riley R. F., Hokama M., Kratz P., Penn H. S., « Federation Proc. » 15, 636 (1956).
54. Chang F. C., Sprunt D. H., « J. Am. Chem. Soc. » 76, 3213 (1954).
55. Chang F. C., Blickenstaff R. T., Feldstein A., Gray J. R., McCaleb G. S., Sprunt D. H., « J. Am. Chem. Soc. » 79, 2161 (1957).
56. Chang F. C., Blickenstaff R. T., Feldstein A., Gray J. R., McCaleb G. S., Sprunt D. H., « J. Am. Chem. Soc. » 79, 2164 (1957).
57. Chang F. C., Feldstein A., Gray J. R., McCaleb G. S., Sprunt D. H., « J. Am. Chem. Soc. », 79, 2167 (1957).
58. Rondoni P., « Boll. Oncol. » 28, 221 (1954).
59. « Progress. Rep. IX Sloan Kettering Inst. for Cancer Res. », giugno 1956.
60. Rapport M. M., Graf L., « Cancer » 8, 538 (1955).
61. Rapport M. M., Graf L., Alonzo N., « Cancer » 8, 546 (1955).
62. Guest editorial, « Cancer Res. » 16, 915 (1956).
63. In corso di pubblicaz. sugli « Annals Acad. Sci. New York ».
64. Witebsky E., Rose N. R., Shulman S., « Cancer Res. » 16, 831 (1956).
65. Pillemer L. e Coll., « Science » 120, 279 (1954).
66. Wardlaw A. C., Pillemer L., « J. Exptl. Med. » 103, 553 (1956).
67. Herbut P. A., Kraemer W. H., « Cancer Res. » 16, 1048 (1956).
68. Chargaff E., « Adv. Prot. Chem. » 1, 9 (1944).
69. Schmitt F. O., « Adv. Prot. Chem. » 1, 30 (1944).
70. Hogeboom G. H., *Methods in enzymology*, vol. I, pag. 16. Acad. Press. Inc. Publ., New York, 1955.
71. Boyd E. M., « J. Biol. Chem. » 143, 131 (1942).

72. ABDERHALDEN E., *Physiological Chemistry*, trad. da W. T. Hall e G. Defren, Wiley, N. Y., 1911.
73. BURT N. S., ROSSITER R. J., « Biochem. J. » 46, 569 (1950).
74. WEST E. S., TODD W. R., *Textbook of biochemistry*, Macmillan, New York, 1951.
75. DEUEL H. J. jr., *Lipids*, vol. II, pag. 381, Jntersci. Publ., Inc., New York, 1955.
76. KIRK E., « J. Biol. Chem. » 123, 637 (1938).
77. YAMAKAWA T., SUZUKI S., « J. Biochem. » (Japan) 38, 199 (1951); 39, 393 (1952); 40, 7 (1953).
77 bis. DOTY P., SCHULMAN J. H., « Discuss. Faraday Soc. » 6, 21 (1949).
78. HAMASATO Y., « Tohoku J. Exptl. Med. » 52, 17 (1950).
79. KABAT E. A., « J. Am. Chem. Soc. » 76, 3709 (1954).
80. LESKOWITZ S., KABAT E. A., « J. Am. Chem. Soc. » 76, 4887 (1954).
81. LESKOWITZ S., KABAT E. A., « J. Am. Chem. Soc. » 76, 5060 (1954).
82. LESKOWITZ S., KABAT E. A., « J. Immunol. » 75, 171 (1955).
83. HOWE C., KABAT E. A., « Arch. Biochem. a. Biophys. » 60, 244 (1956).
84. CARSTEN M. E., KABAT E. A., « J. Am. Chem. Soc. » 78, 3083 (1956).
85. PANGBORN M. C., « J. Biol. Chem. » 168, 351 (1947).
86. PLESCIA O. J., « Cancer Res. » 16, 743 (1956).
87. LANDSTEINER, SIMMS., « J. Exptl. Med. » 38, 127 (1923).
88. EICHWALD E. J., « Cancer Res. » 16, 918 (1956).
89. GRAHAM J. B., GRAHAM R. M., « Cancer » 8, 408 (1955).
90. BLIX G., TISELIUS A., SVENSSON H., « J Biol. Chem. » 137, 485 (1941).
91. GURD F. R. N., ONCLEY J. L., EDSALL J. T., COHN E. J., « Discuss. Faraday Soc. » 6, 70 (1949).
92. MACHEBOEUF M., REBEYROTTE P., « Discuss. Faraday Soc. » 6, 62 (1949).

INDICE

MEMORIE

DELL'ACCADEMIA DELLE SCIENZE

DI TORINO

MEMORIE DELL'ACCADEMIA DELLE SCIENZE DI TORINO 1759-1955

Tomi 1-114 divisi nelle seguenti:
Serie I Tomi 1-40; Serie II Tomi 1-71; Serie III Tomi 1-2.

---

[1] Miscellanea philosophico-mathematica Societatis privatae Taurinensis. Tomus I: 1759.

[2-5] Mélanges de Philosophie et de Mathématique de la Société Royale de Turin pour les années 1760-61 [e [3] 1762-1765; [4] 1766-1769; [5] 1770-1773]. *Senza data.*

[6-10] Mémoires de l'Académie royale des Sciences. Années 1784-1785 [-1790-91]: 1786-93.

[6] 1784-85: *Première partie:* 1786;
[7] *Seconde partie:* 1786.
[8] 1786-87: 1788.
[9] 1788-89: 1790.
[10] 1790-91: 1793.

[11] Mémoires de l'Académie des Sciences de Turin. Années 1792 à 1800. Tome VI: 1801.

[12] Mémoires de l'Académie des Sciences, Lettres et Beaux-Arts de Turin pour les années X et XI [1803-1804]. Sciences physiques et mathématiques. *Première partie:* An. XII [1803-4].

[13] [Gli stessi, *Seconde partie*]. Littérature et Beaux-Arts: 1803.

[14-15] Mémoires de l'Académie impériale des Sciences, Lettres et Beaux-Arts pour les années XII et XIII [1803-05]: 1805.

[14] *Sciences physiques et mathématiques:* 1805.
[15] *Lettres et Beaux-Arts:* 1805.

[16-21] [Gli stessi] pour les années 1805-08 [e 1809-10, 1811-12]: 1809-13.

[16] 1805-08 *Sciences physiques et mathématiques:* 1809.
[17] *Lettres et Beaux-Arts:* 1809.
[18] 1809-10 *Sciences physiques et mathématiques:* 1811.
[19] 1809-10 *Lettres et Beaux-Arts:* 1811.
[20] 1811-12 *Sciences physiques et mathématiques:* 1813.
[21] *Lettres et Beaux-Arts:* 1813.

[22] Mémoires de l'Académie royale des Sciences de Turin pour les années 1813-14. Tome XXII: 1816.
(Diviso in due parti, ognuna con propria numerazione).

[23-40] Memorie della Reale Accademia delle Scienze di Torino. Tomo XXIII [-XL]: 1818-38.
(Divise in due parti, ognuna con numerazione propria, ed intitolate: (I) *Memorie della Classe di Scienze fisiche e matematiche*, e (II) *Memorie della Classe di Scienze morali, storiche e filologiche*).

[41-111] Memorie della Reale Accademia delle Scienze di Torino. Serie II, Tomo 1 [-71]: 1839-1952.
Sino al Tomo 67 divise come i tomi 23-40 della prima serie; dal Tomo 68 divise in *Parte prima*: Classe di Scienze fisiche, matematiche e naturali, e *Parte seconda*: Classe di Scienze morali, storiche e filologiche.

[112-14] Memorie dell'Accademia delle Scienze di Torino. Serie terza. Tomi 1-2, divisi come nella serie prec. (tt. 68 ss.):
Parte I: Classe di Scienze fisiche, matematiche e naturali;
Tomo 1 e 2: 1955.
Parte II: Classe di Scienze morali, storiche e filologiche:
Tomi 1-3: 1952-55.